卫生部“十一五”规划教材

全国高等医药教材建设研究会规划教材

全国高等学校教材

供基础、临床、预防、口腔医学类专业用

医学细胞生物学

第4版

主　编　陈誉华

副主编　杨　恬　李　丰

人民卫生出版社

全国高等学校教材

供基础、临床、预防、口腔医学类专业用

1. 医用高等数学／第5版
2. 医学物理学／第7版
3. 基础化学／第7版
4. 有机化学／第7版
5. 医学生物学／第7版
6. 系统解剖学／第7版
7. 局部解剖学／第7版
8. 组织学与胚胎学／第7版
9. 生物化学／第7版
10. 生理学／第7版
11. 医学微生物学／第7版
12. 人体寄生虫学／第7版
13. 医学免疫学／第5版
14. 病理学／第7版
15. 病理生理学／第7版
16. 药理学／第7版
17. 医学心理学／第5版
18. 法医学／第5版
19. 诊断学／第7版
20. 医学影像学／第6版
21. 内科学／第7版
22. 外科学／第7版
23. 妇产科学／第7版
24. 儿科学／第7版
25. 神经病学／第6版
26. 精神病学／第6版
27. 传染病学／第7版
28. 眼科学／第7版
29. 耳鼻咽喉头颈外科学／第7版
30. 口腔科学／第7版
31. 皮肤性病学／第7版
32. 核医学／第7版
33. 流行病学／第7版
34. 卫生学／第7版
35. 预防医学／第5版
36. 中医学／第7版
37. 计算机应用基础／第4版
38. 体育／第4版
39. 医学细胞生物学／第4版
40. 医学分子生物学／第3版
41. 医学遗传学／第5版
42. 临床药理学／第4版
43. 医学统计学／第5版
44. 医学伦理学／第3版
45. 临床流行病学／第3版
46. 康复医学／第4版
47. 医学文献检索／第3版
48. 卫生法／第3版
49. 医学导论／第3版
50. 全科医学概论／第3版
51. 麻醉学／第2版
52. 急诊医学

策划编辑…窦天舒　皮雪花
责任编辑…皮雪花
封面设计…郭　森
版式设计…郭　森　魏红波

人民卫生出版社 PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE P M P H 遇水消失

ISBN 978-7-117-10204-9

9 787117 102049 >

定价(含光盘)：59.00 元

卫生部“十一五”规划教材
全国高等医药教材建设研究会规划教材

全国高等学校教材

供基础、临床、预防、口腔医学类专业用

医学细胞生物学

第 4 版

主　编　陈誉华

副主编　杨　恬　李　丰

主　审　宋今丹

编　者（按姓氏笔画排序）

左　伋（复旦大学上海医学院）
刘　佳（大连医科大学）
朱振宇（中山大学中山医学院）
宋土生（西安交通大学医学院）
张钦宪（郑州大学医学院）
李　丰（中国医科大学）
李　刚（南昌大学医学院）
李继承（浙江大学医学院）
杨　恬（第三军医大学）
辛　华（山东大学医学院）
陈誉华（中国医科大学）
胡以平（第二军医大学）
徐　晋（哈尔滨医科大学）
章静波（中国协和医科大学）
黄东阳（汕头大学医学院）

秘　书　赵伟东（中国医科大学）

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

医学细胞生物学/陈誉华主编. —4 版. —北京：人民卫生出版社，2008.6

ISBN 978-7-117-10204-9

Ⅰ. 医… Ⅱ. 陈… Ⅲ. 人体细胞学：细胞生物学-医学院校-教材 Ⅳ. R329.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 063711 号

本书本印次封底贴有防伪标。请注意识别。

医学细胞生物学

第 4 版

主　　编：陈誉华
出版发行：人民卫生出版社(中继线 010-67616688)
地　　址：北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼
邮　　编：100078
网　　址：http：//www. pmph. com
E - mail：pmph @ pmph. com
购书热线：010-67605754　010-65264830
印　　刷：北京人卫印刷厂
经　　销：新华书店
开　　本：787×1092　1/16　　**印张**：26.5
字　　数：701 千字
版　　次：1997 年 5 月第 1 版　2008 年 6 月第 4 版第 25 次印刷
标准书号：ISBN 978-7-117-10204-9/R · 10205
定价(含光盘)：59.00 元

版权所有，侵权必究，打击盗版举报电话：010-87613394
(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)

全国高等学校五年制临床医学专业
第七轮 规划教材修订说明

全国高等学校五年制临床医学专业卫生部规划教材从第一轮编写出版至今已有30年的历史。几十年来，在卫生部的领导和支持下，以裘法祖院士为代表的一大批有丰富临床和教学经验、有高度责任感的老教授和医学教育家参与了本套教材的创建和每一轮的修订工作，使我国的五年制临床医学教材不断丰富、完善与更新，形成了一套课程门类齐全、学科系统优化、内容衔接合理的规划教材。本套教材为推动我国医学教育事业的改革和发展做出了历史性巨大贡献。正如老一辈医学教育家亲切地称这套教材是中国医学教育的“干细胞”教材，由她衍生出了八年制和研究生两套规划教材。今天，全国一大批在临床教学、科研、医疗第一线的中青年教授、学者继承和发扬了老一辈的优良传统，积极参与了本套第七轮教材的修订和建设工作，并借鉴国内外医学教育教学的经验和成果，不断完善和提升编写的水平和质量，已逐渐将每一部教材打造成了精品，使第七轮教材更加成熟、完善和新颖。

第七轮教材的修订从2006年5月开始，其修订和编写特点如下：

- 在全国广泛、深入调研基础上，总结和汲取了前六轮教材的编写经验和成果，尤其是对一些不足之处进行了大量的修改和完善，并在充分体现科学性、权威性的基础上，更考虑其全国范围的代表性和适用性。

- 依然坚持教材编写“三基、五性、三特定”的原则。

- 内容的深度和广度严格控制在五年制教学要求的范畴，精练文字压缩字数，以更适合广大五年制院校的要求，减轻学生的负担。

- 在尽可能不增加学生负担的前提下，提高印刷装帧质量，根据学科需要，部分教材改为双色印刷、彩色印刷，以提升教材的质量和可读性。

- 适应教学改革的需求，实现教材的系列化、立体化建设，本轮大部分教材配有《学习指导与习题集》、《实验指导》、《教师用书》以及配套光盘等，且与教材同期出版。

第七轮教材共52种，新增1种，即《急诊医学》。全套教材均为卫生部“十一五”规划教材，绝大部分为普通高等教育“十一五”国家级规划教材，分两批于2008年出版发行。

第七轮 教材目录

1. 医用高等数学 / 第5版　主编　张选群
2. 医学物理学 / 第7版　主编　胡新珉
3. 基础化学 / 第7版　主编　魏祖期
4. 有机化学 / 第7版　主编　吕以仙
5. 医学生物学 / 第7版　主编　傅松滨
6. 系统解剖学 / 第7版　主编　柏树令
7. 局部解剖学 / 第7版　主编　彭裕文
8. 组织学与胚胎学 / 第7版　主编　邹仲之　李继承
9. 生物化学 / 第7版　主编　查锡良
10. 生理学 / 第7版　主编　朱大年
11. 医学微生物学 / 第7版　主编　李　凡　刘晶星
12. 人体寄生虫学 / 第7版　主编　李雍龙
13. 医学免疫学 / 第5版　主编　金伯泉
14. 病理学 / 第7版　主编　李玉林
15. 病理生理学 / 第7版　主编　金惠铭　王建枝
16. 药理学 / 第7版　主编　杨宝峰
17. 医学心理学 / 第5版　主编　姚树桥　孙学礼
18. 法医学 / 第5版　主编　王保捷
19. 诊断学 / 第7版　主编　陈文彬　潘祥林
20. 医学影像学 / 第6版　主编　吴恩惠　冯敢生
21. 内科学 / 第7版　主编　陆再英　钟南山
22. 外科学 / 第7版　主编　吴在德　吴肇汉
23. 妇产科学 / 第7版　主编　乐　杰
24. 儿科学 / 第7版　主编　沈晓明　王卫平
25. 神经病学 / 第6版　主编　贾建平
26. 精神病学 / 第6版　主编　郝　伟
27. 传染病学 / 第7版　主编　杨绍基　任　红
28. 眼科学 / 第7版　主编　赵堪兴　杨培增
29. 耳鼻咽喉-头颈外科学 / 第7版　主编　田勇泉
30. 口腔科学 / 第7版　主编　张志愿
31. 皮肤性病学 / 第7版　主编　张学军
32. 核医学 / 第7版　主编　李少林　王荣福
33. 流行病学 / 第7版　主编　王建华
34. 卫生学 / 第7版　主编　仲来福
35. 预防医学 / 第5版　主编　傅　华
36. 中医学 / 第7版　主编　李家邦
37. 计算机应用基础 / 第4版　主编　邹赛德
38. 体育 / 第4版　主编　裴海泓
39. 医学细胞生物学 / 第4版　主编　陈誉华
40. 医学分子生物学 / 第3版　主编　药立波
41. 医学遗传学 / 第5版　主编　左　伋
42. 临床药理学 / 第4版　主编　李　俊
43. 医学统计学 / 第5版　主编　马斌荣
44. 医学伦理学 / 第3版　主编　丘祥兴　孙福川
45. 临床流行病学 / 第3版　主编　王家良　王滨有
46. 康复医学 / 第4版　主编　南登崑
47. 医学文献检索 / 第3版　主编　郭继军
48. 卫生法 / 第3版　主编　赵同刚
49. 医学导论 / 第3版　主编　文历阳
50. 全科医学概论 / 第3版　主编　杨秉辉
51. 麻醉学 / 第2版　主编　曾因明
52. 急诊医学　主编　沈　洪

全国高等学校临床医学专业第五届教材评审委员会

名誉主任委员　裘法祖

主 任 委 员　陈灏珠

副主任委员　龚非力

委　　员　（以姓氏笔画为序）

于修平　王卫平　王鸿利　文继舫　朱明德　刘国良　李焕章　杨世杰
张肇达　沈　悌　吴一龙　郑树森　原　林　曾因明　樊小力

秘　　书　孙利军

第 4 版前言

本教材为卫生部临床医学专业教材评审委员会审定的全国高等学校卫生部“十一五”规划教材第四版，前三版均由中国医科大学宋今丹先生任主编。第四版教材按照全国高等学校临床医学专业教材评审委员会五届七次会议暨五年制第七轮卫生部规划教材主编人会议精神进行修订。

与第三版教材相比，第四版教材的主要变化是：①按照教材内容的关联性，将原教材的 18 章压缩合并成 15 章，同时增加了细胞工程和干细胞两章新内容。②插图增加到 270 幅，除化学结构式和照片外，均为彩色插图。③考虑到同时出版本教材的配套教材《医学细胞生物学实验指导和习题集》，在每章之后不再编写复习题，但增加了小结内容。④为增加学生的学习兴趣，让他们了解细胞生物学知识的积累过程并培养其科学思维能力，在教材中部分重要知识点出现的地方，增设了“经典实验”栏目。⑤教材配有教学光盘。同时，由于细胞生物学的进展很快，在修订后的第四版教材中也适当反映了近几年来细胞生物学的一些重要研究成果。

修订后的第四版教材共 5 篇 17 章，包括第一篇“细胞生物学概论”（第一～三章）、第二篇“细胞的结构与功能”（第四～九章）、第三篇“细胞的社会性”（第十～十二章）、第四篇“细胞的基本生命活动”（第十三～十五章）及第五篇“细胞工程”（第十六～十七章）。在书后列出了本教材的主要参考书目和参考文献，并配有中英文索引。

本教材的作者来自全国十四所院校，为完成本书的编写，他们付出了大量的时间和精力，力图使本教材成为适合我国五年制医学专业教学的精品教材。我对他们为本教材做出的贡献表示衷心感谢。同时感谢第三军医大学连小华教授、中山大学医学院师宪平老师、郑州大学医学院冯若老师、大连医科大学孙媛老师等对本教材编写的贡献。

本教材得到了中国医科大学宋今丹先生、四川大学华西医学中心杨抚华先生、中国医学科学院章静波先生和哈尔滨医科大学张贵寅先生的关怀和帮助，宋今丹先生主审了本版教材，章静波先生则欣然提笔，撰写了细胞工程一章，在此表示衷心感谢。

在本教材编写过程中，中国医科大学卫生部细胞生物学重点实验室的赵伟东副教授做了大量的秘书工作，方瑾教授、陈澄副教授、尚德淑副教授、李波副教授、李家滨和张涛老师做了大量的协助工作；教材中的插图由赵伟东副教授和中国医科大学医学美术室徐国成、王凤珍、李虹等老师绘制完成，在此一并表示感谢。

由于我们的专业水平和写作能力有限，本教材难免出现不足甚至错误，希望使用本教材的老师和同学们提出宝贵意见，以便再版时更正。

陈誉华

2008 年 5 月于中国医科大学

目　录

第一篇　细胞生物学概论

第一章　绪论 1

第一节　细胞生物学概述 / 1

一、细胞生物学的概念与研究内容 / 1

二、细胞生物学在生命科学中的地位 / 2

第二节　细胞生物学发展的几个主要阶段 / 2

一、细胞的发现与细胞学说的创立 / 2

二、光学显微镜下的细胞学研究 / 3

三、实验细胞学阶段 / 3

四、亚显微结构与分子水平的细胞生物学 / 4

第三节　细胞生物学与医学 / 5

一、细胞生物学与医学的关系 / 5

二、细胞生物学的某些主要研究领域与医学意义 / 6

第二章　细胞的概念与分子基础 10

第一节　细胞的基本概念 / 10

一、细胞是生命活动的基本单位 / 10

二、原核细胞 / 10

三、真核细胞 / 12

四、非细胞生命形态——病毒 / 14

第二节　细胞的起源与进化 / 14

一、原始细胞的形成 / 15

二、原核细胞向真核细胞的演化 / 17

三、单细胞生物向多细胞生物的进化 / 18

第三节　细胞的分子基础 / 18

一、生物小分子 / 19

二、生物大分子 / 19

第三章　细胞生物学的研究方法 32

第一节　显微镜技术 / 32

一、光学显微镜技术 / 32

二、电子显微镜技术 / 35

三、纳米显微技术 / 38

第二节　细胞的分离和培养 / 39

一、不同类型细胞的分离 / 39

二、细胞培养 / 41

第三节　细胞组分的分离和纯化技术 / 44

一、细胞组分的分级离心 / 44
二、层析法分离蛋白质 / 46
三、蛋白质电泳 / 48
第四节　细胞化学和细胞内分子示踪技术 / 50
一、酶细胞化学技术 / 50
二、免疫细胞化学技术 / 50
三、放射自显影技术 / 50
四、活细胞内分子示踪 / 51
第五节　细胞功能基因组学研究技术 / 53
一、基因的基本研究技术 / 53
二、RNA 干扰技术 / 57
三、蛋白质相互作用的研究技术 / 58
四、生物芯片技术 / 59
五、蛋白质组学研究技术 / 59
第六节　生物大分子的结构测定 / 61
一、核磁共振技术 / 61
二、X-射线衍射技术 / 61

第二篇　细胞的结构与功能

第四章　细胞膜与物质的跨膜运输 63
第一节　细胞膜的化学组成与分子结构 / 64
一、细胞膜的化学组成 / 64
二、细胞膜的特性 / 70
三、细胞膜的分子结构模型 / 73
第二节　小分子物质的跨膜运输 / 76
一、膜的选择性通透和简单扩散 / 76
二、膜转运蛋白介导的跨膜运输 / 77
第三节　大分子和颗粒物质的跨膜运输 / 85
一、胞吞作用 / 85
二、胞吐作用 / 89
第四节　细胞表面及其特化结构 / 90
一、细胞外被和胞质溶胶 / 90
二、细胞表面的特化结构 / 91
第五节　细胞膜异常与疾病 / 92
一、载体蛋白异常与疾病 / 92
二、离子通道异常与疾病 / 93
三、膜受体异常与疾病 / 94

第五章　细胞的内膜系统与囊泡转运 97
第一节　内质网 / 97
一、内质网的化学组成 / 97
二、内质网的形态结构 / 98

三、内质网的基本类型 / 99
四、内质网的功能 / 100
第二节　高尔基复合体 / 106
一、高尔基复合体的形态结构 / 107
二、高尔基复合体的化学组成 / 108
三、高尔基复合体的功能 / 110
第三节　溶酶体 / 111
一、溶酶体的形态结构和化学组成 / 111
二、溶酶体的类型 / 113
三、溶酶体形成与成熟过程 / 114
四、溶酶体的功能 / 115
第四节　过氧化物酶体 / 116
一、过氧化物酶体的形态结构 / 116
二、过氧化物酶体的酶类组成 / 117
三、过氧化物酶体的功能 / 117
四、过氧化物酶体的发生 / 118
第五节　囊泡与囊泡转运 / 118
一、囊泡的来源与类型 / 119
二、囊泡转运 / 120
第六节　细胞内膜系统与医学的关系 / 122
一、内质网的病理变化 / 122
二、高尔基复合体的病理形态变化 / 123
三、溶酶体与疾病 / 123
四、过氧化物酶体与疾病 / 124

第六章　线粒体与细胞的能量转换　127
第一节　线粒体的基本特征 / 127
一、线粒体的形态、数量和结构 / 127
二、线粒体的化学组成 / 129
三、线粒体的遗传体系 / 129
四、核编码蛋白质向线粒体的转运 / 132
五、线粒体的起源与发生 / 135
第二节　细胞呼吸与能量转换 / 136
一、细胞呼吸 / 136
二、细胞能量的转换分子——ATP / 136
第三节　细胞的能量转换 / 137
一、葡萄糖在细胞质中的糖酵解 / 137
二、线粒体基质中的三羧酸循环 / 138
三、线粒体氧化磷酸化耦联与ATP形成 / 139
第四节　线粒体与细胞死亡 / 142
一、与细胞死亡有关的线粒体机制 / 143
二、线粒体控制细胞死亡的假说 / 143
第五节　线粒体与医学 / 143

一、疾病过程中的线粒体变化／144
二、mtDNA 突变与疾病／144

第七章　细胞骨架与细胞的运动　146

第一节　微管／146
一、微管蛋白与微管的结构／147
二、微管结合蛋白／147
三、微管的装配与动力学／148
四、微管的功能／150
第二节　微丝／153
一、肌动蛋白与微丝的结构／153
二、微丝结合蛋白及其功能／153
三、微丝的装配机制／155
四、微丝的功能／157
第三节　中间纤维／160
一、中间纤维的结构和类型／160
二、中间纤维的装配和调节／161
三、中间纤维的功能／162
第四节　细胞的运动／163
一、微管与细胞运动／164
二、微丝与细胞运动／164
三、细胞运动的调节机制／166
第五节　细胞骨架与疾病／167
一、细胞骨架与肿瘤／167
二、细胞骨架蛋白与神经系统疾病／168
二、细胞骨架与遗传性疾病／168

第八章　细胞核　170

第一节　核膜／170
一、核膜的化学组成／171
二、核膜的结构与区域化作用／171
三、核孔复合体与核-质间的物质运输／172
四、核纤层的结构与功能／175
第二节　染色质与染色体／176
一、染色质的组成成分／176
二、常染色质与异染色质／178
三、染色质组装成染色体／179
四、染色体的形态结构／180
五、核型与染色体带型／183
第三节　核仁／184
一、核仁的形态结构和化学组成／184
二、核仁的功能／185
三、核仁周期／186

第四节　核骨架 / 187
一、核骨架的形态结构与化学组成 / 187
二、核骨架的功能 / 187
第五节　细胞核的功能 / 189
一、遗传信息的贮存 / 189
二、遗传信息的复制 / 189
三、遗传信息的转录 / 191
第六节　细胞核与疾病 / 191
一、细胞核形态异常与肿瘤 / 191
二、染色体异常与肿瘤 / 191

第九章　基因信息的传递与蛋白质合成　193
第一节　基因及其结构 / 193
一、基因及其信息流向 / 193
二、基因的结构及特点 / 194
第二节　基因转录和转录后加工 / 198
一、基因转录的一般特点 / 198
二、原核细胞的基因转录 / 198
三、真核细胞的基因转录和转录后加工 / 199
第三节　蛋白质的生物合成 / 204
一、遗传信息翻译的基本原理 / 204
二、蛋白质合成的场所——核糖体 / 206
三、蛋白质合成的一般过程 / 207
四、肽链合成后的加工修饰 / 210
第四节　基因表达的调控 / 211
一、基因表达的一般特点 / 212
二、原核基因的表达调控 / 212
三、真核基因的表达调控 / 214

第三篇　细胞的社会性

第十章　细胞连接与细胞粘连　223
第一节　细胞连接 / 223
一、紧密连接 / 224
二、锚定连接 / 226
三、通讯连接 / 229
第二节　细胞黏附分子与细胞粘连 / 231
一、钙黏素家族 / 232
二、选择素 / 233
三、免疫球蛋白超家族 / 235
四、整联蛋白家族 / 236

第十一章　细胞外基质及其与细胞的相互作用　241

第一节　细胞外基质的主要组成成分 / 241
一、氨基聚糖与蛋白聚糖 / 242
二、胶原与弹性蛋白 / 246
三、细胞外基质中的非胶原性黏合蛋白 / 250
第二节　细胞外基质的特化结构——基底膜 / 253
一、基底膜的分布 / 254
二、基底膜的组成成分 / 254
三、基底膜的生物学功能 / 255
第三节　细胞外基质与细胞间的相互作用 / 255
一、细胞外基质对细胞生物学行为的影响 / 255
二、细胞对细胞外基质的影响 / 256

第十二章　细胞的信号转导　258

第一节　细胞外信号 / 258
第二节　受体 / 259
一、受体种类 / 259
二、受体作用的特点 / 263
第三节　细胞内信使 / 263
一、cAMP 信使体系 / 264
二、cGMP 信使体系 / 265
三、二酯酰甘油/三磷酸肌醇信使体系 / 267
四、钙离子/钙调蛋白信使体系 / 267
第四节　信号转导与蛋白激酶 / 268
一、信号转导的特点 / 268
二、酪氨酸激酶 / 269
三、丝氨酸/苏氨酸激酶 / 271
四、几种细胞信号转导通路 / 272
第五节　信号转导与疾病 / 276
一、受体异常与疾病 / 276
二、G 蛋白与疾病 / 277
三、蛋白激酶与疾病 / 277

第四篇　细胞的基本生命活动

第十三章　细胞分裂与细胞周期　279

第一节　细胞分裂 / 279
一、无丝分裂 / 280
二、有丝分裂 / 280
三、减数分裂 / 284
第二节　细胞周期及其调控 / 288
一、细胞周期的基本概念 / 288
二、细胞周期各时相的动态变化与生物大分子的合成 / 289

三、细胞周期的调控 / 290
四、癌基因和抑癌基因在细胞周期调控中的作用 / 301
五、卵母细胞减数分裂及其调控 / 302
第三节　细胞周期与医学的关系 / 305
一、细胞周期与组织再生 / 305
二、细胞周期与肿瘤发生 / 306
三、细胞周期与其他医学问题 / 308

第十四章　细胞分化 **310**
第一节　细胞分化的基本概念 / 310
一、多细胞生物个体发育的一般过程与细胞分化潜能 / 310
二、细胞决定与细胞分化 / 311
三、细胞的去分化和转分化 / 312
四、细胞分化的时-空性 / 313
五、细胞分裂与细胞分化 / 314
第二节　细胞分化的分子基础 / 314
一、基因组的活动模式 / 314
二、胞质中的细胞分化决定因子与传递方式 / 316
三、基因选择性表达的转录水平调控 / 317
四、小RNA在细胞分化中的作用 / 322
第三节　细胞分化的调节因素 / 323
一、细胞间相互作用在细胞分化中的作用 / 323
二、激素对细胞分化的调节 / 325
三、环境因素对细胞分化的影响 / 325
第四节　细胞分化与肿瘤细胞 / 326
一、肿瘤细胞的分化特征 / 326
二、肿瘤细胞的分化起源 / 327
三、肿瘤细胞向正常细胞的诱导分化 / 328
第五节　细胞分化与再生 / 328
一、再生的本质与方式 / 328
二、再生的过程 / 329
三、再生的医学意义 / 330

第十五章　细胞衰老与细胞死亡 **331**
第一节　细胞衰老 / 331
一、细胞衰老的概念 / 331
二、细胞衰老的表现 / 332
三、细胞衰老的学说与机制 / 332
第二节　细胞死亡 / 334
一、细胞死亡的原因 / 334
二、细胞死亡的特征与形式 / 335
三、细胞自噬及意义 / 335
第三节　细胞凋亡 / 335

一、细胞凋亡的概念与特征 / 337
二、细胞凋亡的影响因素 / 340
三、细胞凋亡的分子机制 / 340
四、细胞凋亡的检测 / 345
五、细胞凋亡与疾病 / 345

第五篇　细 胞 工 程

第十六章　细胞工程 347
第一节　细胞工程的主要相关技术 / 347
一、大规模细胞培养 / 347
二、细胞融合 / 350
三、细胞核移植 / 351
四、基因转移 / 353
第二节　细胞工程的应用 / 355
一、单克隆抗体的制备 / 355
二、药用蛋白的生产 / 355
三、疾病的细胞治疗 / 356

第十七章　干细胞 360
第一节　干细胞概述 / 360
一、干细胞的存在与类型 / 360
二、干细胞的形态和生化特征 / 361
三、干细胞的增殖特性 / 361
四、干细胞的分化特性 / 362
五、干细胞生理活动的微环境 / 363
第二节　胚胎干细胞 / 364
一、胚胎干细胞存在的位置 / 365
二、胚胎干细胞的生物学特性 / 366
三、胚胎干细胞的体外分化 / 367
第三节　成体干细胞 / 368
一、造血干细胞 / 369
二. 间充质干细胞 / 370
三、神经干细胞 / 371
四、皮肤干细胞 / 372
五、肠干细胞 / 372
六、肝干细胞 / 373
第四节　特殊类型的干细胞 / 374
一、精原干细胞 / 374
二、癌干细胞 / 376
第五节　干细胞与医学 / 377
一、细胞治疗 / 377

二、组织工程／378
三、药物的毒性和疗效评价／378

主要中文参考书及文献 380

主要英文参考书及文献 381

中英文索引 384

第一篇　细胞生物学概论

第一章　绪　　论

自然界中分布有成千上万种生物，小至细菌，大到花草树木、鸟兽虫鱼直至人类，肉眼上很难找到它们结构上的相同之处，但在显微镜下，这些千姿百态的生物的基本结构是相同的，都是由细胞（cell）构成的。细胞是生物体结构和功能的基本单位。细胞的发现，至今已有300多年的历史。细胞生物学（cell biology）以细胞为研究对象，经历了从显微水平到亚显微和分子水平的发展过程，成为今天在分子层次上研究细胞精细结构和生命活动规律的学科。细胞生物学是当代生命科学中发展迅速和活跃的学科，其研究的新知识、新技术不断向医学领域渗透，已成为认识疾病发病机制、获取疾病防治措施的基础和支柱学科。

第一节　细胞生物学概述

一、细胞生物学的概念与研究内容

细胞最早于1665年由英国科学家R. Hooke发现，是组成人类和所有生物体的基本单位（非细胞形态的病毒除外）。单细胞生物，如细菌，本身就是一个生命个体；多细胞生物个体由一个前体细胞（如高等动物的受精卵）通过高度有序的分裂增殖、分化、生长和发育而成。因此可以说，细胞是生命的基本单位。

细胞生物学的研究对象是细胞。自发现细胞以来，随着科学技术的进步特别是分子生物学技术方法的建立和渗透，对细胞的研究在不断地发生变化，从传统的细胞学逐渐发展成为现代的细胞生物学。细胞生物学是从细胞的显微、亚显微和分子三个水平对细胞的各种生命活动开展研究的学科。细胞的显微水平研究主要利用显微镜技术来完成；细胞的亚显微结构及其功能研究主要采用电子显微镜技术；分子生物学技术和生物物理学方法常用于细胞的分子水平研究。

细胞生物学的特点是把结构和功能结合起来，并关注细胞间的相互关系，来了解生物体的生长、发育、分化、繁殖、运动、遗传、变异、衰老和死亡等基本生命现象的机制和规律。对细胞某些结构和功能的深入研究，逐渐衍生出一些分支学科，如细胞遗传学（cytogenetics）、细胞生理学（cytophysiology）、细胞社会学（cytosociology）、膜生物学（membrane biology）、染色体生物学（chromosome biology）等。近些年来，随着包括人类在内的一些生物基因组序列分析的完成，以研究完整细胞中所有基因与蛋白质的表达、结构和功能差异为主要内容的基因组学（genomics）及蛋白质组学（proteomics）新兴研究领

域的形成，使细胞生物学的研究内容愈加丰富多彩、研究进展日新月异。可以展望，今后将会出现与基因组学和蛋白质组学互为结合的细胞组学（cytomics）。

二、细胞生物学在生命科学中的地位

细胞生物学是生命科学的重要分支学科。生命科学研究的核心内容，是生命的物质基础，生命的起源和进化，生物的繁殖、生长、发育、衰老、死亡、遗传与变异等生命现象的规律和机制。生命的物质基础是核酸和蛋白质等生物大分子，这些生物大分子必须被有序地构建及装配成细胞内组分并进入细胞内一定的功能体系中才能表现出生命现象。即使是自然界中的非细胞形态的生命体——病毒，也只能在细胞中才表现出生命特征。生命起源于一个原始细胞，生命的基本现象如生殖、生长、发育、衰老、死亡等过程都体现在生命之单位细胞上。

从生命结构层次上看，细胞生物学介于分子生物学和个体生物学之间，同它们相互衔接、相互渗透。目前，细胞生物学的两种重要研究方式是：一方面从细胞的表型特征入手，探索隐藏在其背后的分子机制；另一方面则从基因或蛋白质等生物大分子入手，了解其对细胞功能或行为的影响。故而细胞生物学也被称为细胞分子生物学或分子细胞生物学。细胞生物学和分子生物学同是现代生命科学的基础，它们广泛渗透到发育生物学、遗传学、神经生物学和免疫生物学等研究领域。

细胞生物学既是生命科学的基础学科，也是现代生命科学中的前沿学科之一。许多科学家论断，21 世纪是生命科学的世纪。在分子层次上研究细胞生命活动过程中各种生命现象的规律和机制的细胞生物学，无疑将在生命科学中发挥重要的作用。本世纪头几年的细胞生物学研究成果，如干细胞与动物无性克隆研究进展、小 RNA 和人类基因组中非编码蛋白序列在细胞生命活动中作用的不断发现，已充分表明细胞生物学是生命科学中最为活跃的研究领域之一。

第二节　细胞生物学发展的几个主要阶段

细胞生物学的形成和发展经过了漫长的历程。细胞生物学是随着研究手段的逐步改进和理论上的不断创新而逐渐形成和发展起来的。

一、细胞的发现与细胞学说的创立

细胞的发现与显微镜的发明是分不开的。第一台显微镜是荷兰眼镜匠 H.和 Z. Janssen 兄弟于 1590 年试制的。1665 年英国人 Hook 应用自制的放大倍数不太高的显微镜，在观察植物软木组织时，发现了许多蜂窝状排列的小室称为“细胞”（cell，小室之意）。当时他所看到的细胞只是植物死细胞的细胞壁。1673 年和 1677 年荷兰科学家 A. Van Leeuwenhoek 使用能放大 300 倍的显微镜，观察到了池塘中的原生动物纤毛虫、细菌、人和哺乳动物的精子，后来又观察到鲑鱼红细胞及其核（1695）。1827 年 K. E. V. Bear 在蛙的卵中看到了细胞核。1831 年 R. Brown 在植物的叶片细胞中也看到了细胞核。1835 年，E. Dujardin 在根足虫和多孔虫细胞内观察到胶液状物质，称为肉样质（sarcode）；1839 年 J. Purkinje 将动物神经细胞中的胶状液描述为原生质（protoplasm）。至此，细胞的一些主要结构被发现了。

德国植物学家 M. J. Schleiden（1838）和动物学家 T. Schwann（1839）根据他们自己

的研究并总结前人的工作，提出了细胞学说（cell theory），肯定“一切生物，从单细胞生物到高等动物和植物均由细胞组成，细胞是生物形态结构和功能活动的基本单位”。后来，德国科学家 R. Virchow（1855）明确提出“一切细胞只能来自原来的细胞”的论点。他还指出，机体的一切病理现象都基于细胞的损伤。他的这些观点是对细胞学说的重要补充。细胞学说的建立，对生命科学的许多领域的研究和发展起到了积极的推动作用。恩格斯评价细胞学说为 19 世纪自然科学的三大发现之一（与物理学的能量转换定律和达尔文的进化论学说并列）。

二、光学显微镜下的细胞学研究

从 19 世纪中叶到 20 世纪初期，细胞研究的主要内容是应用固定和染色技术，在光学显微镜下观察细胞的形态结构和细胞的分裂活动。

在细胞形态结构上，认为动物细胞内的“肉样质”和植物细胞内的原生质（1864 年由 H. Von Mohl 提出）具有同样意义，并提出原生质理论。从此，细胞被看作是由细胞膜包围的一大团原生质。原生质理论建立之后，又明确地把细胞核周围的原生质称为细胞质（cytoplasm），把细胞核内的原生质叫做核质（karyoplasm）。

1841 年 R. Remak 观察到鸡胚血细胞的直接分裂。W. Flemming 经过钻研，改进了细胞的固定和染色技术，于 1882 年首先说明细胞的间接分裂过程，并把该细胞分裂命名为有丝分裂（mitosis），把细胞的直接分裂称之为无丝分裂（amitosis）。E. Straburger 依据染色体在细胞分裂中的行为把有丝分裂过程分为四个期，即前期、中期、晚期和末期。他和 Flemming 分别通过植物材料和动物材料研究表明，细胞核从上一代细胞到后一代细胞一直保持着其物质上的连续性。K. Schneider（1878）发现，细胞在分裂中能把纵裂为二的染色体平均地分配到两个子细胞中，将此过程称为核分裂（karyokinesis）。19 世纪 80 年代末，T. Boveri 报道，动物体在形成配子过程中，染色体数目减少了一半。之后，Straburger 在植物中也观察到了同一现象。1905 年 J. B. Farmer 和 J. E. More 把生物体有性生殖过程中，生殖细胞通过分裂使染色体数目减少一半的分裂方式称为减数分裂（meiosis）。减数分裂为细胞分裂的主要类型之一。染色体数目在减数分裂中减少了一半，但通过受精过程在子一代又恢复了原有的数目，使核在两代个体间保持着连续性。

1890 年 Van Beneden 和 Boveri 在观察细胞分裂时发现了中心体。随后，线粒体（R. Altmann，1894；C. Benda，1897）、高尔基体（C. Golgi，1898）也相继被发现。

三、实验细胞学阶段

从 20 世纪初期到 20 世纪中叶为实验细胞学阶段。这一阶段的主要特点是，细胞学的研究不只是借助光学显微镜着重于形态学结构的观察，而且还采用了多种实验手段对细胞的各种生化代谢和生理功能进行研究。同时细胞学还与相邻学科相互渗透形成一些重要的分支学科。

1902 年 Boveri 和 W. Suttan 把染色体的行为与 G. Mendel 的遗传因子联系起来，提出“染色体遗传理论”。同年，W. Cannon 认为遗传因子在染色体上，并提出“遗传的染色体学说”。1909 年 W. Johannsen 把遗传因子命名为 gene（基因）。1910 年 T. Morgan 根据他和合作者的大量实验工作，建立了“基因学说”，证明基因是遗传性状的基本单位，且直线地排列在染色体上并成为连锁群。由此，细胞学与遗传学结合起来形成了细胞遗传学。

1909 年，R. Harrison 建立了组织培养技术，直接观察和分析细胞的形态和生理活动。

1943 年，A. Claude 应用高速离心机从活细胞中分离出细胞核和各种细胞器，如线粒体、叶绿体和微粒体（内质网的碎片），然后再进一步研究它们的生理功能、化学组成和各种酶类在细胞器中的定位等，由此使细胞学与生理学相融合形成了细胞生理学。R. Feulgan 于 1921 年发明了 Feulgan 染色法来测定细胞核内的 DNA。之后，J. Brachet（1940）建立了 Unna 染色技术，检测细胞中的 RNA。T. Casperson（1940）采用紫外光显微分光光度法检验细胞中的 DNA 含量，他们的工作还证明蛋白质的合成可能与 RNA 有关。

四、亚显微结构与分子水平的细胞生物学

光学显微镜受到其分辨率和放大倍率的限制，不可能对细胞作进一步精细研究。1933 年德国 E. Ruska 等人研制出第一台电子显微镜（electron microscopy）。电子显微镜的发明和 20 世纪中叶分子生物学的发展，标志着亚显微结构与分子水平相结合的细胞生物学的开端。

（一）电子显微镜的应用使细胞学研究深入到亚显微水平

Ruska 最初研制的电子显微镜的放大倍率达 10 000 倍。之后，由于技术上的不断革新，电子显微镜的放大倍率达到几十万倍，分辨率由最初的 50nm 提高到零点几个纳米。同时用于电镜标本制作的超薄切片技术也在不断改进。从 20 世纪 40 年代，特别是 50 年代中期到 60 年代末期，电子显微镜的应用使细胞的形态学研究深入到亚显微水平，发现了过去在光镜下看不到的细胞器，如内质网（K. R. Porter，1945）、溶酶体（De duve，1956）、核糖体（Robertis，1958）；明确了过去在光镜下看到的高尔基体（A. J. Dalton 等，1953）和线粒体（G. E. Palade，1953）等细胞器及其微细结构。随着电子显微镜技术的进展，除对细胞进行超微结构观察之外，也逐步深入到结构与功能相结合的探索，即应用生物化学与生物物理学手段对分离出的细胞器进行化学组分分析。这些工作的积累为细胞生物学的形成打下基础。20 世纪 70 年代，超高压电子显微镜的出现，又相继发现了细胞质中纵横交错的网状细胞骨架结构（Porter，1976）和细胞核基质内的网状核骨架结构（E. G. Fey，1984）。20 世纪 80 年代初期，扫描隧道显微镜（G. Binning 和 H. Rohrer，1981）和原子力显微镜（Binning）的发明，使细胞的亚显微结构观测深入到超微（大分子）结构层次，可用于研究 DNA 和蛋白质等生物大分子的表面立体结构。

（二）分子生物学的研究进展促进了细胞生物学的形成与发展

自 20 世纪 50 年代始，分子生物学进入一个快速的发展时期。1953 年 J. Watson 和 F. Crick 提出 DNA 双螺旋结构模型。1958 年，M. Meselson 和 F. Stahl 通过 DNA 复制研究，证明 DNA 复制为半保留复制。同年，Crick 发表了“中心法则”（central dogma），指出遗传信息的流向是 DNA→RNA→蛋白质。G. Gamow（1955）发表了三联体密码假说。M. Nirenberg 和 Mathaei（1961）依据从核糖核酸实验获得的结果，确定了 DNA 中编码每一种氨基酸的“密码”。这些研究成果及后来建立的分子生物学研究技术，如 DNA 重组技术（P. Berg，1968）、DNA 序列分析技术（F. Sanger 和 W. Gilbert，1975）等不断地渗透到细胞学各领域，使细胞的形态结构和生理功能研究深入到分子水平。这样，在 20 世纪 60 年代，形成了从分子水平、亚细胞水平和细胞整体水平来探讨细胞各种生命活动的学科，即细胞生物学。

20 世纪 70 年代特别是 80 年代以后，细胞生物学在分子水平研究上获得了快速发展。在细胞膜结构与功能研究领域，提出了细胞膜结构的液态镶嵌模型（fluid mosaic model）（S. J. Singer 和 G. L. Nicolson，1972），这成为目前研究细胞许多生物学行为的基础。在蛋白质合成、分选和定向运输方面，提出了信号肽引导核糖体结合到内质网膜的信号肽假说

(signal hypothesis)(G. Blobel, 1975),鉴定出新合成的细胞核蛋白靶向运输的核定位信号(nuclear localization signal)(A. E. Smith, 1984)。在线粒体与细胞的能量转换研究上,继1961年P. Mitchell建立的线粒体氧化磷酸化耦联机制的化学渗透假说之后,提出了线粒体基粒的ATP酶复合体通过结合变构机制(binding-change mechanism)合成ATP的模型(P. D. Boyer, 1989)。在细胞骨架与细胞运动研究方面,鉴定出基于微管的介导细胞内运动的驱动蛋白(kinesin)(M. P. Sheetz和S. Brady, 1985),接着相继了解到细胞内物质运输、细胞器定位和分布、细胞分裂过程中染色体运动的机制。在基因表达调控研究中,相继发现了真核细胞基因中内含子(intron)的存在(P. A. Sharp和R. Roberts, 1977)和免疫球蛋白基因重排机制(S. Tonegawa, 1976),揭示了小核RNA(small nuclear RNA)与蛋白质组成的复合体在pre-mRNA加工中的作用(J. A. Steitz, 1979),分离出DNA序列特异性的真核细胞转录因子(R. Tjian, 1986)。在细胞的社会性研究方面,整联蛋白(integrin)的发现(R. O. Hynes, 1986)导致了对细胞连接的分子基础的认识,也揭示了细胞外基质与细胞骨架的联系;Src蛋白的酪氨酸激酶活性及其与细胞增殖关系的发现(T. Hunter和B. M. Sefton, 1980),使人们认识到酶活性在细胞信号转导中的中心作用。在细胞增殖周期研究中,相继发现了MPF(maturation promoting factor)(Y. Masui和C. L. Markert, 1971)和细胞周期素(cyclin)(T. Hunt, 1983);原癌基因(proto-oncogene)的发现(J. M. Bishop和H. E. Varmus, 1976)在催生人类肿瘤基因的发现的同时,也丰富了对细胞周期调节机制的认识。在细胞分化研究方面,继20世纪60年代J. Gurdon在非洲爪蟾的细胞核移植实验中证明已分化的蝌蚪肠上皮细胞的细胞核仍然保持着能分化成为成体爪蟾的能力之后,英国爱丁堡Roslin研究所I. Wilmut和其同事将成年绵羊乳腺上皮细胞的核移植到另一只羊的去核的卵细胞中,成功地克隆出绵羊多利(Dolly)(1997),证明细胞分化的本质是基因的选择性表达;1983年,瑞士Gehring实验室工作人员在绘制果蝇触角足复合体基因图谱过程中发现了同源盒基因(homeobox gene)。在细胞衰老与死亡研究领域,提出了细胞衰老的“端粒钟(telomere clock)学说(C. Harley, 1990),鉴定出控制程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)的基因(H. R. Horviz, 1986)。在干细胞与细胞工程研究领域,率先建立的小鼠胚胎干细胞系(G. R. Martin, M. Evans和M. Kaufman, 1981),促进了整体水平的基因操作(如转基因小鼠)技术在细胞分化与发育及人类疾病(动物模型)的研究进展;之后,人类胚胎干细胞建系也获得成功(J. A. Thomson和J. D. Gearhart, 1998)。这些研究成果奠定了现代细胞生物学的基础。

1990年人类基因组计划(human genome project, HGP)启动,在这一世界性范围内的科学大合作中,中国科学家于1993年加入,承担其中1%的序列分析任务。2000年美、英、日、法、德、中6国学者共同绘制了人类基因组框架图。随着2003年人类基因组序列分析的完成,逐渐发展起来的基因组学和蛋白质组学,以及新近于真核细胞内发现的控制基因信息传递的小RNA等新兴领域生命信息和新技术体系的引入,预示着细胞生物学又将进入一个新的快速发展时期。

第三节 细胞生物学与医学

一、细胞生物学与医学的关系

细胞生物学是现代医学的基础和支柱学科。医学要解决的问题,是阐明人的生、老、病、死等生命现象的机制和规律,并对疾病进行诊断、治疗和预防。人类生命是从受精卵

开始的，经过了胎儿、新生儿、幼年、成年、老年直至死亡的过程，这些过程都是以细胞为单位进行的。细胞正常结构的损伤和功能紊乱，必然导致人体组织器官的病变，并由此引起疾病。例如，严重危害人类健康的癌症，就是正常细胞癌变的结果；心血管疾病，如动脉粥样硬化的发生与动脉壁内皮细胞的特性改变有关；老年性痴呆等神经退行性疾病是神经元选择性变性死亡的结果。因此，细胞是体现人类生、老、病、死之单位，细胞生物学与医学的关系极为密切。细胞生物学的理论与技术的研究成果不断向医学领域渗透，在很大程度上促进了医学的进步。

细胞生物学的研究内容在不断地加深与医学科学的结合，期望能对人体各种疾病的发病机制予以深入阐明，并试图在诊断和治疗上提出有效的技术手段，这就是医学细胞生物学（medical cell biology）的主要研究内容。

医学细胞生物学是医学院校学生的重要基础医学课程之一。它既是临床医学的基础，也与基础医学的其他学科，特别是人体胚胎学、医学遗传学、生理学、病理学及分子生物学等的关系非常密切。对医学生来说，学好细胞生物学，不仅能为学习其他医学课程打下扎实基础，而且有助于培养良好的科研思维习惯和科学素养，在今后的临床工作中，不断地发现问题、研究问题和解决问题。

二、细胞生物学的某些主要研究领域与医学意义

现代细胞生物学研究主要从分子水平揭示生物在生理或病理状态下细胞层面上所表现出的特征和行为。细胞生物学中许多领域的研究进展很快，这可能会成为推动医学向前发展的一个新的基础。

（一）细胞的信号转导

在高等动物和人类，各种生命活动，如神经系统、内分泌系统、免疫系统的运行都离不开细胞与细胞间的信息联系。细胞间的信息联系主要是通过神经递质、激素和旁分泌（paracrine）等信号分子来完成的，这些信号分子与细胞表面或细胞内部的受体结合，并引起下游胞内信号分子的级联反应，实现对细胞调节的过程称为信号转导（signal transduction），其中整个信息传递过程的路径谓之信号转导通路（signaling pathway）。细胞的信号转导研究是细胞生物学领域一个很活跃的研究前沿，其主要研究内容是了解信号转导通路中各信号分子之间的相互关系，包括蛋白质的互作、修饰、降解、转位的生物学效应，以及不同信号转导通路间的相互应答（cross-talk）。细胞信号转导的生物学效应几乎涵盖了细胞所有的生命现象。因此，通过对细胞信号转导机制的研究，可了解到细胞的运动、增殖、分化及死亡等活动的机制和规律。

细胞信号转导的研究让我们了解到某些疾病的发病机制。例如，信号转导通路中的受体异常是高胆固醇血症和重症肌无力病人的发病原因。在家族性高胆固醇血症病人，其肝细胞膜上的低密度脂蛋白（LDL）受体减少，致使肝细胞对血液中 LDL 的摄入能力降低，从而引起高胆固醇血症。在重症肌无力患者的体内产生了抗乙酰胆碱受体的抗体，抗体与乙酰胆碱受体结合，使通过受体进行的信号转导过程受阻，出现重症肌无力症。霍乱弧菌所致的剧烈腹泻也是细胞信号转导通路受阻的典型例子。霍乱毒素能够糖基化肠黏膜细胞中的 G 蛋白的 α 亚基，使 G 蛋白持续失活，导致细胞的离子代谢紊乱和细胞内外渗透压失衡，大量水分进入肠腔。另外，现有研究还表明，信号转导通路中的蛋白激酶功能异常与肿瘤形成有关。

（二）细胞分化与干细胞研究

脊椎动物和人类的机体由 200 多种不同类型的细胞组成。这些细胞的结构和功能各

异，是细胞分化的结果。细胞分化（cell differentiation）是指在个体发育中，由单个受精卵产生的细胞在形态结构、生化组成和功能等方面形成明显的稳定性差异的过程。由一个受精卵来源的细胞为什么会变得如此多样与不同？这是细胞分化的研究内容。细胞分化的机制，是数百年来许多生命科学家付出毕生精力而至今尚未完全解决的难题。目前，人们认识到细胞分化的实质是基因的选择性表达，是胚胎细胞逐渐由“全能”到“多能”、“单能”，最后成为“终末细胞”的发育过程。因此，处于发育相应阶段的细胞被分别称为全能性干细胞（totipotent stem cell）、多能性干细胞（pluripotent stem cell）、单能或专能性干细胞（unipotent stem cell）。人类胚胎早期的囊胚内细胞团（inner cell mass，ICM）细胞是多能性干细胞，它具有分化为成熟个体中所有细胞类型的潜能，已在体外成功建系，称为胚胎干细胞（embryonic stem cell，ESC）。而来源于成体组织的单能性干细胞则称为成体干细胞（adult stem cell）。干细胞是生物个体发育和细胞分化的基础，对干细胞生物学特性的研究将有助于对生命的基本现象，即发育和细胞分化机制的认识。

胚胎干细胞可以在体外培养、传代，且保持其无限增殖能力和多向分化潜能，这使人们看到了彻底修复和再生人体病变器官的前景。理论上，干细胞经特定因子刺激后，可发育成特化的细胞，用于治疗由细胞功能障碍或组织受损引起的疾病，这就是所谓的细胞治疗；而利用胚胎干细胞，克隆人体组织器官，以治疗（替代病变器官）为目的的克隆技术称为治疗性克隆。因此，目前干细胞已成为生命医学研究领域的热点。

（三）细胞增殖与细胞周期调控

细胞增殖是细胞生命活动的重要特征，是个体生长和发育的基础。组成人体的细胞多达 2×10^{14} 个，是细胞增殖的结果。细胞增殖以周期性循环的方式进行。一个细胞经过一系列生化事件而复制它的组分，然后一分为二，这种周期性的复制和分裂过程即为细胞（增殖）周期（cell cycle）。在个体发育中，胚胎期细胞分裂增殖极为活跃，成体期除部分细胞不断分裂增殖之外，大多数细胞的增殖速度减慢，有的甚至停止分裂。细胞是如何知道什么时候分裂，什么时候停止分裂的，以及细胞不对称分裂的机制等是目前细胞增殖周期调控研究的主要内容。细胞增殖与细胞周期的调控一直是细胞生物学研究的重要领域，目前已发现了真核细胞内操纵细胞周期进程的三类细胞周期调控因子，它们是细胞周期蛋白、细胞周期蛋白依赖性激酶和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子；也发现了若干个监控细胞周期进程的反馈调控机制，即细胞周期检查点（cell cycle checkpoint）。

细胞的增殖失控与人类的某些疾病，如肿瘤的发生等密切相关。肿瘤细胞的主要特性是细胞的无休止和无序的分裂并形成肿块。因此，研究细胞增殖与细胞周期的调控机制，也是了解肿瘤发生机制和控制肿瘤生长的重要途径。肿瘤的发生机制与防治研究是医学领域的重要研究课题，其中基因与肿瘤发生的关系、细胞信号转导与肿瘤、肿瘤干细胞特性以及癌细胞诱导分化研究等是目前肿瘤细胞生物学的主要研究领域。癌基因、抑癌基因的发现，以及其介导的信号转导机制的阐明，极大地丰富了人们对细胞增殖规律与细胞周期调控机制的认识。

（四）细胞衰老与细胞死亡

细胞衰老与细胞死亡是生物界的普遍规律。

细胞衰老（cellular aging，cell senescence）是指细胞的形态结构和生理功能逐渐衰退的现象。在人类和高等动物，细胞总体的衰老将导致个体的老化。因此，细胞衰老是机体的衰老和老年病发病的基础。迄今在细胞衰老机制研究上已取得了一些进展，如随着细胞分裂次数的增加，发现染色体端粒的末端不断缩短；在低等生物线虫中，发现了影响线虫寿命的衰老基因和抗衰老基因（也称长寿基因）；在过早老化的 Werner 综合征病人，由于 DNA 复制时解旋障碍，其体外培养的细胞与正常人的细胞相比，只分裂了较少的次数就

发生了衰老和死亡。可以想象，随着细胞衰老的规律和机制的阐明，人类延缓个体衰老的愿望将可能实现。

细胞死亡（cell death）是指细胞生命活动的结束，可区分为坏死和凋亡两大类。细胞凋亡（apoptosis）是指细胞在特定条件下遵循自身的程序而结束自己生命的过程，它是由基因控制的主动性死亡，因此也称为程序性细胞死亡。细胞凋亡是个体发育过程中必不可少的生物学事件，细胞凋亡异常，将引起发育畸形，如并指（趾）、肛门闭锁、两性畸形和神经管发育缺陷等。一些神经退行性疾病，如帕金森（Parkinson）病、阿尔茨海默（Alzheimer）病等与神经元凋亡密切相关。研究细胞凋亡的机制不仅对揭示生命活动的规律，也对了解疾病的发生、发展有重要意义。细胞凋亡研究领域非常活跃，继发现引起凋亡的基因家族（如 *ced*，*bcl-2*，*p53*）和诱导细胞凋亡的信号转导途径（如细胞表面死亡受体途径，线粒体途径）之后，又发现了一些新的凋亡形式，如细胞失巢凋亡（anoikis）和自噬性凋亡（autophagic apoptosis）等。随着研究的深入，将会对细胞凋亡的机制有更深入的了解，并有可能为细胞凋亡相关性疾病提出有效的治疗手段。

（五）细胞的基因组学、蛋白质组学

基因研究是 20 世纪生命科学的主线。进入 21 世纪，随着人类基因组序列草图在 2001 年的完成，生命科学进入了一个新的纪元——后基因组时代（postgenome era）。逐渐形成的基因组学和蛋白质组学将细胞生物学研究推向一个新的领域。

基因组（genome）是指细胞或生物体的一套完整的单倍体遗传物质，是所有不同染色体上全部基因和基因间的 DNA 的总和。基因组学是研究生物基因的组成，组内各基因的精确结构、相互关系及表达调控的学科。基因的表达调控研究是近年来细胞生物学中十分活跃的领域，其中关于表观遗传调控的研究，即表观遗传学（epigenetics）是该领域新的研究热点。表观遗传学是研究没有 DNA 序列变化并且可以遗传的基因功能变化的学科，如 DNA 甲基化，组蛋白密码（histone code，指组蛋白的乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化、糖基化和羰基化等影响转录因子与 DNA 结合的动态转录调控），基因组印记（genomic imprinting）以及表观基因组学（epigenomics）等。新近，控制基因信息流向的小 RNA 的不断发现又将为阐明细胞的生命活动规律打开新窗口。

蛋白质组“proteome”源于“protein”与“genome”杂合，是指由一个细胞，一个组织或生物的基因组所表达的全部蛋白质。细胞的蛋白质组学以细胞内全部蛋白质的存在及其活动方式为研究对象，从整体角度分析细胞内动态变化的蛋白质组成成分、表达水平与修饰状态，进而了解蛋白质之间的相互作用与联系，揭示蛋白质功能与细胞生命活动的规律。蛋白质的亚细胞定位对蛋白质功能的发挥起关键性作用，蛋白质亚细胞定位信息暗示着其生物学功能。目前基于亚细胞成分（如细胞膜、线粒体、溶酶体、内质网、高尔基体、细胞核等）分离技术的亚细胞蛋白质组学（subcellular proteomics）已成为蛋白质组学研究的重要内容。蛋白质组学研究的另一途径是，着重于寻找和筛选引起 2 个样本之间的差异蛋白质谱产生的有意义的因素，揭示细胞生理和病理过程的本质、对外界环境刺激的反应途径以及细胞调控机制，同时获得对某些蛋白质的功能分析，此即比较蛋白质组学。因此，蛋白质组学的研究不仅能为阐明细胞生命活动的规律提供物质基础，也能为探讨疾病的机制、疾病诊治和新药开发等提供重要的理论依据和实际解决途径。

小结

自然界中所有生物和人类的机体都是由细胞构成的，细胞是生物体结构和功能的基本单位。细胞生物学的研究对象是细胞，经历了从显微水平的细胞学研究到亚显微与分子水

平研究的发展，成为目前在分子层次上研究细胞的结构和生命活动规律的学科。细胞生物学是生命科学和医学的基础和支柱学科。细胞生物学在包括细胞的信号转导、细胞分化与干细胞研究、细胞增殖与细胞周期调控、细胞衰老与细胞死亡等方面的研究进展，加深了人们对疾病机制的认识。新近发展起来的细胞的基因组学、蛋白质组学乃至细胞组学研究，可能会成为推动医学向前发展的基础。

（陈誉华）

第二章　细胞的概念与分子基础

除病毒之外，在地球上存在的所有生物都是由细胞构成的。简单的低等生物仅由单细胞组成，而复杂的高等生物则由各种执行特定功能的细胞群体构成。细胞是生命的基本单位。所有生物体的细胞都由一个共同的祖先细胞进化而来。祖先细胞经过无数次的分裂、突变和选择，使它的后代逐渐趋异，呈现出生命的多样性。组成多样性生物体的细胞可区分为原核细胞和真核细胞两大类，原核细胞结构简单，真核细胞高度进化，出现了细胞核和由内膜系统形成的各种细胞器。

第一节　细胞的基本概念

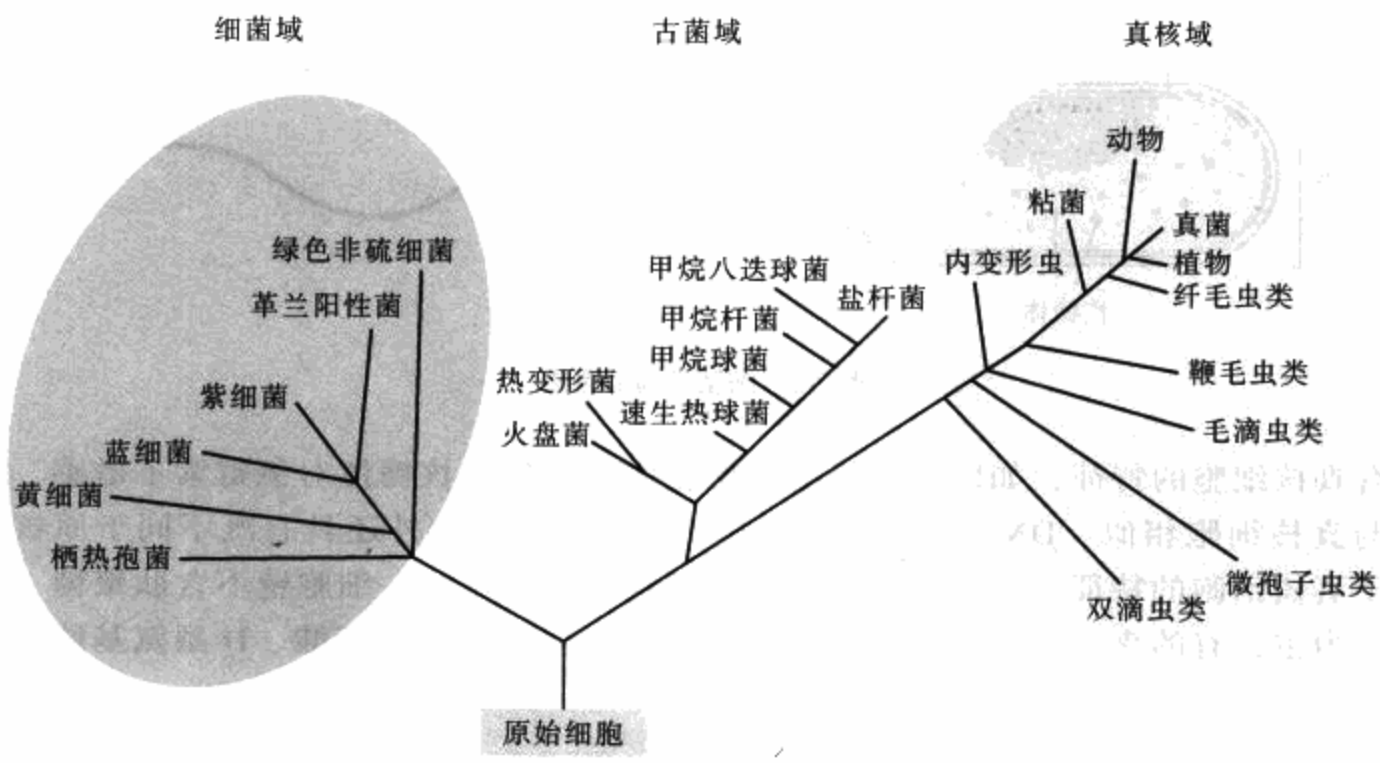
一、细胞是生命活动的基本单位

所有的生物都是由细胞组成的，细胞是生命活动的基本单位。对细胞的概念，可以从以下角度去理解：①细胞是构成有机体的基本单位；②细胞具有独立完整的代谢体系，是代谢与功能的基本单位；③细胞是有机体生长与发育的基础；④细胞是遗传的基本单位，细胞具有遗传的全能性；⑤没有细胞就没有完整的生命。必须强调，病毒虽然是非细胞形态的生命体，但它们必须在细胞内才能表现基本的生命特征（繁殖与遗传）。因此，就病毒而言，细胞是生命活动的基本单位这一概念也是完全适用的。

在种类繁多、浩如烟海的细胞世界中，根据其进化地位、结构的复杂程度、遗传装置的类型与主要生命活动的方式，20 世纪 60 年代著名细胞生物学家 H. Ris 最早提出将细胞分为原核细胞（prokaryotic cell）与真核细胞（eukaryotic cell）两大类。近 20 年来，大量的分子进化与细胞进化的研究表明，原核生物并不是统一的一大类，在极早的时候就演化为两大类：古细菌（archaeobacteria）与真细菌（eubacteria）。古细菌可能是细胞生存的更为原始的类型。1990 年，美国的 C. R. Woese 提出，将生物界划分为 3 个域：①细菌域（bacteria），包括支原体、衣原体、立克次体、细菌、放线菌及蓝藻等，称为真细菌；②古菌域（archaea），包括产甲烷菌、盐杆菌、热原质体等，称为古细菌；③真核域（eukarya），包括真菌、植物和动物（图 2-1）。基于这个分类，某些生物学家建议将生物界的细胞分为三大类型：原核细胞、古核细胞与真核细胞。但目前普遍的观点是，仍把古核细胞归属于原核细胞。

二、原核细胞

原核细胞结构简单，仅由细胞膜包绕，在细胞质内含有 DNA 区域，但无被膜包围，该区域一般称为拟核（nucleoid）。拟核内仅含有一条不与蛋白质结合的裸露 DNA 链。此外，原核细胞的细胞质中没有内质网、高尔基复合体、溶酶体，以及线粒体等膜性细胞器，但含有核糖体。与真核细胞相比，原核细胞较小，直径约为 1 到数个微米。原核细胞的另一特点是在细胞膜之外，有一坚韧的细胞壁（cell wall），细胞壁的主要成分是蛋白多糖和糖脂。常见的原核细胞有支原体、细菌、放线菌和蓝绿藻（蓝细菌）等，其中支原体是最小的原核细胞。



●图 2-1　生物三域分类的系统树

1. 支原体是最小最简单的细胞　支原体（mycoplasma）是目前已知的最小的细胞，其直径约为 0.1~0.3μm，结构极其简单。支原体的细胞膜由磷脂和蛋白质构成，但没有细胞壁，胞质内呈环形的双链 DNA 分子分散存在，该 DNA 含有供支原体生活必须数量的遗传信息，仅能指导约 400 种蛋白的合成，核糖体是它惟一的细胞器。支原体与医学关系密切，是肺炎、脑炎和尿道炎的病原体。

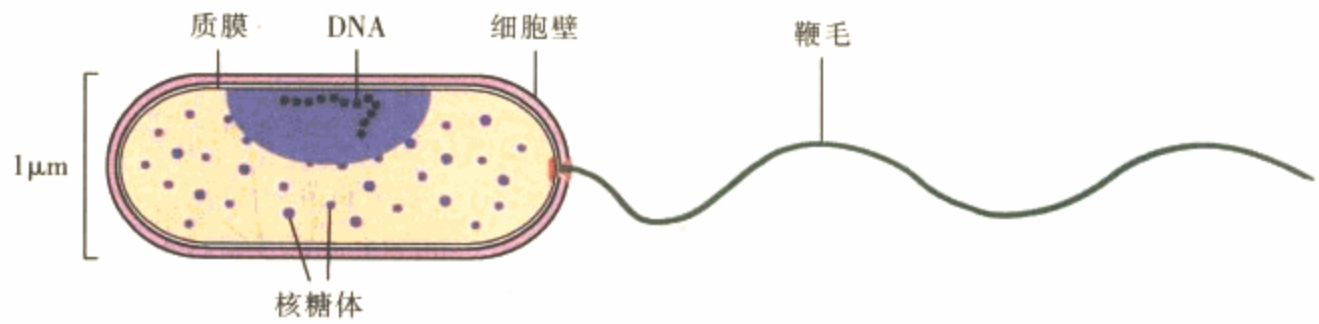
2. 细菌是原核细胞的典型代表　细菌（bacteria）是原核生物的典型代表，在自然界之中广泛分布，常见的有球菌、杆菌和螺旋菌，许多细菌可致人类疾病。

细菌的外表面为一层坚固的细胞壁，其主要成分为肽聚糖（peptidoglycan）。有时在细胞壁之外还有一层由多肽和多糖组成的荚膜（capsula），荚膜具有保护作用，也是细菌在真核细胞内寄生的保护伞。在细胞壁里面为由脂质分子和蛋白质组成的细胞膜。细菌的细胞膜比较特殊，常可分为细胞膜内膜、细胞膜外膜，以及内外膜中间的间隙。有些蛋白位于外膜上，称为外膜蛋白，位于内膜上的蛋白称为内膜蛋白，还有些蛋白贯穿于内外膜。细菌的细胞膜上还含有某些代谢反应的酶类，如组成呼吸链的酶类。此外，细菌的细胞膜有时可内陷，形成中间体（mesosome），它与 DNA 的复制和细胞分裂有关。

细菌的细胞质内的拟核区域含有环状 DNA 分子，其结构特点是很少有重复序列，构成某一基因的编码序列排列在一起，无内含子。除此之外，在细菌的细胞质内还含有 DNA 以外的遗传物质，通常是一些小的能够自我复制的环状质粒（plasmid）。

细菌的细胞质中含有丰富的核糖体，每个细菌约含 5 000~50 000 个，其中大部分游离于细胞质中，只有一小部分附着在细胞膜的内表面。细菌核糖体的沉降系数为 70S，由一个 50S 的大亚基和一个 30S 的小亚基组成，它是细菌合成蛋白质的场所。细菌蛋白质合成的特点是，在细胞质内转录与翻译同时进行，即一边转录一边翻译，无需对转录而来的 mRNA 进行加工（图 2-2）。

3. 古细菌多生活在极端环境中　古细菌是一类很特殊的细菌，多生活在极端的生态环境中，如较早了解的产甲烷菌（Methanogens）、后来陆续发现的生活在高盐浓度中的盐杆菌（Halobacteria）、生活在 80℃以上硫磺温泉中的硫化叶菌（Sulfolobus）、生长在燃烧煤堆中的热原质体（Thermoplasma）等。它们具有原核细胞的某些特征，如无核膜及内膜系



●图 2-2　细菌结构示意图

统；也有真核细胞的特征，如以甲硫氨酸起始合成蛋白质、核糖体对氯霉素不敏感、RNA 聚合酶与真核细胞相似、DNA 具有内含子并结合组蛋白；此外还具有既不同于原核细胞也不同于真核细胞的特征，如：细胞膜中的脂类是不可皂化的；细胞壁不含肽聚糖，有的以蛋白质为主，有的含杂多糖，有的类似于肽聚糖，但都不含胞壁酸、D 型氨基酸和二氨基庚二酸。

三、真核细胞

真核细胞比原核细胞进化程度高、结构复杂。由真核细胞构成的生物，包括单细胞生物（如酵母）、原生生物、动植物及人类等。真核细胞区别于原核细胞的最主要特征是出现有核膜包围的细胞核。

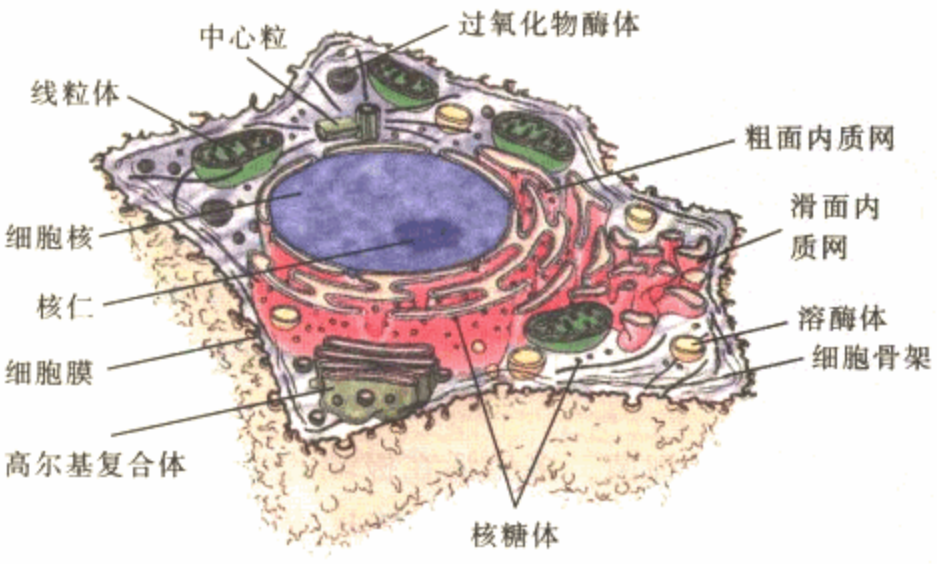
（一）真核细胞的形态与大小

高等生物由 200 多种真核细胞组成，其形态是多种多样的，常与细胞所处的部位及功能相关，如游离于液体的细胞多近于球形，像红细胞和卵细胞；组织中的细胞一般呈椭圆形、立方形、扁平形、梭形和多角形，如上皮细胞多为扁平形或立方形，具有收缩功能的肌细胞多为梭形，具有接受和传导各种刺激的神经细胞常呈多角形，并出现多个树枝状突起，反映出细胞的结构与其功能状态密切相关。

不同类型细胞的大小差异很大，一般用微米（μm）和纳米（nm）作为描述细胞大小的单位。大多数细胞的直径在 10~20μm 之间，但有些细胞较大，如卵细胞，在人约为 100μm，在一些鸟类动物可达几个厘米。

（二）真核细胞的基本结构

在光学显微镜下，真核细胞可分为细胞膜（cell membrane）、细胞质（cytoplasm）和细胞核（nucleus），在细胞核中可看到核仁结构。电子显微镜下，在细胞质中可以看到由单位膜组成的膜性细胞器，如内质网、高尔基复合体、线粒体、溶酶体、过氧化物酶体，以及微丝、微管、中间纤维等骨架系统。在细胞核中也可看到一些微细结构，如染色质、核骨架（图 2-3）。一般将在光学显微镜下看到的结构称为显微结构，而把在电镜下看到的结构称为亚显微结构（submicroscopic structure）。



●图 2-3　动物细胞结构模式图

真核细胞是以生物膜的进一步分化为基础，使细胞内部构建形成许多更为精细

的具有专门功能的结构单位。真核细胞虽然结构复杂，但可以从以下 4 个方面理解真核细胞的结构特点：

1. 以脂质及蛋白质成分为基础的膜相结构体系——生物膜系统　生物膜系统是指以生物膜（biological membrane）为基础而形成的一系列膜性结构或细胞器，包括细胞膜、内质网、高尔基复合体、线粒体、溶酶体、过氧化物酶体及核膜等。组成这些膜性结构或细胞器的膜具有相似的单位膜（unit membrane）结构，即电镜下的内外两层致密的深色带和中间层的浅色带，膜厚度在 8~10nm 之间。这些膜性结构或细胞器均含有其特殊的酶系或蛋白，在细胞内各自独立地执行其功能。如细胞膜的主要功能是进行物质交换、信息传递、细胞识别及代谢调节等作用；核膜把细胞分为细胞质和细胞核两部分，不但使遗传物质得到更好的保护，而且在维持细胞核与细胞质之间的物质交换方面起重要作用；线粒体是产能细胞器，为细胞的活动提供所需的能量；内质网是细胞内蛋白质和脂类等生物大分子合成的场所；高尔基复合体是合成物质加工、包装与分选的细胞器；溶酶体则是细胞内的消化器官，能消化分解各种生物大分子。

2. 以核酸-蛋白质为主要成分的遗传信息表达体系——遗传信息表达系统　真核细胞的遗传物质被包围在细胞核中，储存遗传信息的 DNA 是以与蛋白质结合形式而存在的，并被包装成为高度有序的染色质结构。DNA 与蛋白质的结合与包装程度决定了 DNA 复制和遗传信息的表达，即使是转录产物 RNA 也是以与蛋白质结合的颗粒状结构存在。

3. 由特异蛋白质分子构成的细胞骨架体系——细胞骨架系统　细胞骨架是由一系列纤维状蛋白组成的网状结构系统，广义的细胞骨架包括细胞质骨架与核骨架，狭义的细胞骨架则指细胞质骨架。细胞质骨架主要由微丝、微管和中间纤维组成，其功能是维系细胞的形态和结构，参与细胞运动、细胞内物质运输、细胞分裂及信息传递等生命活动过程。细胞核骨架由核纤层蛋白（lamin）与核骨架组成，它们与基因表达、染色体包装和分布有密切关系。

4. 核糖体与细胞质溶胶　核糖体（ribosome）也称核蛋白体，电镜下呈颗粒状，直径约为 15~25nm，是合成蛋白质的机器。核糖体由 RNA 和蛋白质组成，RNA 约占核糖体的 60%，蛋白质约占 40%。核糖体中的 RNA 主要构成核糖体的骨架，将蛋白质串联起来，并决定蛋白质的定位。

在细胞质中除了细胞器和细胞骨架结构之外，其余的则为可溶性的细胞质溶胶（cytosol）。细胞与环境、细胞质与细胞核，以及细胞器之间的物质运输、能量传递、信息传递都要通过细胞质溶胶来完成。细胞质溶胶约占细胞总体积的一半，是均质而半透明的液体部分，其主要成分是蛋白质，占细胞质总量的 20%左右，故使细胞质呈溶胶状。细胞质溶胶中的蛋白质很大一部分是酶，多数代谢反应都在细胞质溶胶中进行，如糖酵解、糖异生，以及核苷酸、氨基酸、脂肪酸和糖的生物合成反应。细胞质溶胶的化学组成除大分子蛋白质、多糖、脂蛋白和 RNA 之外，还含有小分子物质水和无机离子 K^+、Na^+、Cl^-、Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 等。

这 4 种基本结构体系构成了细胞内部结构紧密、分工明确、功能专一的各种细胞器，并以此为基础保证了细胞生命活动具有高度程序化与高度自控性。

真核细胞与原核细胞比较有很大差异，这种差异不仅体现在形态结构上，也表现在基因组（genome）组成上。此外，真核细胞的细胞器也含有 DNA：在线粒体中含有少量的 DNA，可编码线粒体 tRNA、rRNA 和组成线粒体的少数蛋白。表 2-1 总结了原核细胞与真核细胞的差异。

表 2-1　原核细胞与真核细胞的比较

特　征	原核细胞	真核细胞
细胞结构		
核膜	无	有
核仁	无	有
线粒体	无	有
内质网	无	有
高尔基复合体	无	有
溶酶体	无	有
细胞骨架	有细胞骨架相关蛋白	有
核糖体	有，70S	有，80S
基因组结构		
DNA 量（信息量）	小	大
DNA 分子结构	环状	线状
染色质或染色体	仅有一条 DNA，DNA 裸露，不与组蛋白结合，但可与少量类组蛋白结合	有 2 个以上 DNA 分子，DNA 与组蛋白和部分酸性蛋白结合，以核小体及各级高级结构构成染色质与染色体
基因结构特点	无内含子，无大量的 DNA 重复序列	有内含子和大量的 DNA 重复序列
转录与翻译	同时进行（在胞质内）	核内转录，胞质内翻译
转录与翻译后大分子的加工与修饰	无	有
细胞分裂	无丝分裂	有丝分裂，减数分裂，无丝分裂

四、非细胞生命形态——病毒

在生物界中，病毒（virus）是惟一的非细胞形态的生命体，是迄今发现的最小、结构最简单的生命存在形式。绝大多数病毒必须在电子显微镜下才能看到。病毒主要是由一个核酸分子（DNA 或 RNA）与蛋白质组成的核酸-蛋白质复合体，含有 DNA 的病毒称为 DNA 病毒，含有 RNA 的病毒称为 RNA 病毒。有的病毒结构更简单，仅由一个有感染性的 RNA 或蛋白质组成，仅由 RNA 组成的病毒称为类病毒（viroid），仅由蛋白质组成的病毒称为朊病毒（prion）。病毒的结构简单到不能独立完成其生命活动过程，必须在活细胞内才能表现出它们的基本生命活动，因此病毒也被视为不“完全”的生命体，是彻底的寄生物。

根据病毒寄生的宿主不同，可将病毒分为动物病毒、植物病毒和细菌病毒，其中细菌病毒又称为噬菌体。多数动物病毒进入细胞的主要方式是靠细胞的“主动吞饮”作用来实现的。进入细胞内的病毒核酸利用宿主细胞的全套代谢系统，以病毒核酸为模板，进行病毒核酸的复制、转录并翻译病毒蛋白，然后装配成新一代的病毒颗粒，最后从细胞释放出来，再感染其他细胞，进入下一轮病毒增殖周期。因此离开活细胞，病毒就无法增殖或生存。病毒在细胞内的增殖过程是病毒与细胞相互作用的非常复杂的过程。

第二节　细胞的起源与进化

目前认为，地球上所有生物的细胞都是从一个共同的祖先细胞进化而来的，最初细胞的形成经历了漫长的过程，并逐渐进化为真核细胞及多细胞生物。细胞起源的过程，实际上就是生命发生的过程。表 2-2 列出了基于目前认识而推断的细胞起源与进化的时间表。

表 2-2　推断的细胞起源与进化时间表

年代(距今)	发生事件	年代(距今)	发生事件
45 亿年	地球形成	35 亿年	蓝细菌形成(原核细胞,需氧)
44 亿年	海洋出现	15 亿年	真核细胞形成
38 亿年	生命出现(原始生命体、原始细胞形成)	12 亿年	多细胞生物形成(藻类)

一、原始细胞的形成

(一) 地球上原始生命的诞生

生命起源于水。原始生命是由原始地球上的非生命物质通过化学作用，经过漫长的自然演化过程逐步形成的。这个过程大致可以分为四个阶段：①从无机小分子形成生物单分子即有机小分子物质；②从有机小分子物质形成生物大分子物质；③从生物大分子物质组成多分子体系；④从多分子体系演变为原始生命。

1. 从无机小分子形成有机小分子物质　早期的地球经过若干亿年的演变，火山喷出的气体形成原始大气，主要含有二氧化碳、氮气、氢气及少量的甲烷、氨等，但几乎没有氧气，使原始地球的大气层呈还原状态。原始大气物质在雷电、紫外线和火山爆发等因素作用下，可能聚集成简单的有机小分子，如氨基酸、核苷酸、糖和脂肪酸。在实验室模拟原始地球的条件，如水中的氢气、甲烷和氨气的混合物在真空放电、紫外线照射等条件下，可形成包括氨基酸在内的各种有机小分子。因此人们推断原始地球大气的还原状态揭示了生命起源所需的基本物质。

在原始地球，简单的有机小分子与地壳表面的水体作用，形成含有机化合物的水溶液，在某些火山活动区域有可能形成浓的溶液。这些稀的和浓的溶液最后汇集到大的水体或原始海洋中。这就是现今大家普遍接受的观点：生命起源于早期地球“温暖小水池”的“有机汤”中。

2. 从有机小分子物质形成生物大分子物质　一般认为，在原始地球上形成的有机小分子被雨水冲刷到原始海洋，经过长期的进化和选择，逐渐聚合成生物大分子：核苷酸与核苷酸之间能够通过磷酸二酯键相连接，并逐步形成线性多核苷酸；氨基酸和氨基酸之间能够通过肽键相连接，并逐步形成多肽。美国科学家福克斯（F. Fox）等人曾进行合成生命大分子的模拟实验。将各种氨基酸混合，置于 130~180℃下加热一个小时，或加入多磷酸后 60℃温育较长时间，能产生具有肽键结构的类蛋白物质。同时，还证明多核苷酸也能按这种方式生成。以上实验，说明了有机化合物和生命大分子可以在化学合成过程中实现。

3. 从生物大分子物质组成多分子体系　生物大分子本身并不能独立表现生命现象，只有当它们形成了多分子体系时，才有可能演化成为原始生命。在早期地球的原始海洋中，由有机小分子聚合而来的生物大分子进一步形成由许多多肽分子及多肽-核酸组成的大分子，包含脂质分子在内于水溶液中形成所谓的“团聚体”或“微球体”，漂浮在原始海洋中，构成独立的多分子体系。

4. 从多分子体系演变为原始生命　多分子体系表面可能产生和存在催化功能，能够促进各类单体的聚合，并促使产生更高级的原始蛋白和核酸，经过长期的进化过程，核酸-蛋白质微滴能够从无生命的海洋中摄取化学分子和能量，体积逐渐增大到足以分裂出与“亲代”微滴相似的“子代”微滴，并利用有利的性状组合，继续增长和分裂。当出现具有原始新陈代谢和遗传特征（自复制）时，就标志着原始的生命的产生。

经典实验：Miller 模拟实验

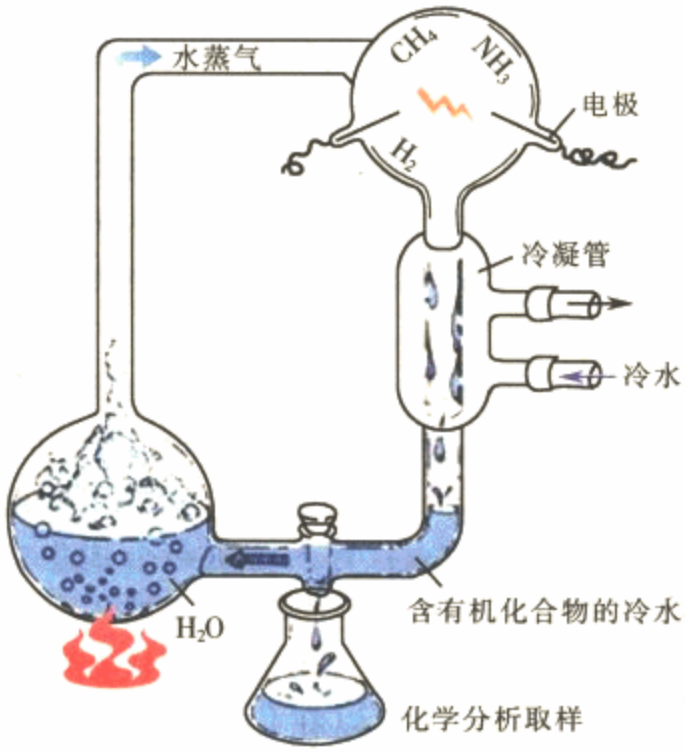
背景知识

生命起源是一个极其复杂而又难以研究的问题。为了解释生命起源的原因，科学家进行了许多探索和实验，形成了各种各样的生命起源学说。虽然 19 世纪 70 年代恩格斯在《反杜林论》中就指出："生命的起源必然是通过化学的途径实现的"；20 世纪 20 年代奥巴林（A. I. Oparin）和霍尔丹（J. B. S. Haldane）相继提出生命起源的化学进化观点，认为最初的生命是在地球温度下降以后，在极其漫长的时间内，在原始地球的条件下，无机物转变为有机物，有机物发展为生物大分子和多分子体系，直到演变出原始的生命体；但这些都只是理论的推测，还缺乏令人信服的实验证据。

为了验证上述理论，1953 年美国芝加哥大学研究生米勒（S. L. Miller）在其导师尤利(H. C. Urey）指导下，首次在实验室内模拟原始地球还原性大气中的雷鸣闪电，结果从无机物合成出有机物（特别是多种组成蛋白质的氨基酸），这是生命起源研究的一次重大突破，称之为米勒模拟实验（Miller's simulated experiment）。

实验内容

实验装置如图 2-4 所示。



●图 2-4　有机分子的自发形成

将水注入左下方的 500 毫升烧瓶内，抽出空气。然后打开左侧的活塞，泵入 CH_4、NH_3 和 H_2 的混合气体（模拟还原性大气）。再将烧瓶内的水煮沸，使水蒸气驱动混合气体在玻璃管内不断循环，进入右上方的烧瓶（带有电极）中，并在其中连续进行火花放电（模拟雷鸣闪电）一周，再经冷凝器冷却后，产生的物质沉积在管道中（模拟原始大气中生成的有机物被雨水冲淋到原始海洋），然后进行取样分析。此实验结果得到的 20 种小分子有机化合物中，包含 11 种氨基酸，其中有 4 种氨基酸（甘氨酸、丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸）是天然蛋白质中所含有的。

发表论文

Stanley L. Miller（University of Chicago, Chicago, USA）:

A production of amino acids under possible primitive earth conditions. Science, 1953, 117 (3046) : 528-529

后续影响

米勒的实验结果，引起了许多科学家的兴趣，"米勒将生命起源研究搬进实验室，开辟了生命起源研究的新途径"。在随后 50 多年中，科学家们利用类似米勒实验的条件，合成出了许多被认为与生命起源有关的有机物质。可以说，几乎全部的生物小分子，现在都可以通过模拟原始地球的条件，在实验室内合成。

虽然科学家们证明了生命物质能从这些实验中产生出来，但这些实验室结果只解释

了与生命体有联系的一些分子结构的产生，还没有彻底解释这些分子最后是怎样互相结合并进行生命活动的。生命的起源确实是让人着迷的问题，在米勒的启发下，科学家们不断把目光投向更遥远的星球——火星、土卫六或者彗星，试图从它们的“原始汤”中寻找新的答案。

（二）原始细胞的形成

1. 具有自我复制能力的多聚体的形成　核苷酸与氨基酸能各自聚合形成大的多聚体。多聚体的形成是原始细胞形成的关键步骤。关于核苷酸与氨基酸多聚体（即核酸与蛋白质）的起源，普遍认为是首先产生了能自我复制的 RNA 多聚体，然后在 RNA 指导下合成了蛋白质。同时，多核苷酸 RNA 所携带的信息也因碱基互补配对从一代传到另一代。20 世纪 80 年代以来具有催化能力的 RNA 即核酶的发现为这一观点提供了有力证据。核酶不仅能催化核酸的剪接，而且也能催化氨基酸间肽键的形成，以及 tRNA 与氨基酸之间键的形成与断裂。

随着进化的演进，随机产生的某些氨基酸多聚体可能具备了某些酶的特性，它们可以作为催化剂催化 RNA 分子的复制，而 RNA 多聚体则可通过其自身核苷酸排列顺序来指导原始蛋白的合成。因此，在生命进化过程中，原始的核酸多聚体和氨基酸多聚体是相互依存、相互作用的。

2. 膜的出现与原始细胞的诞生　生命进化受自然界选择的影响，为了保持多核苷酸的自我复制，以及避免多核苷酸指导合成的优质蛋白质丢失，需要一个将它们包围起来的膜出现。人们推断在生命出现前的原始液体表面，磷脂分子能自发地装配成包围 RNA 和蛋白质的膜结构，这种初级的形态实体经过自然选择便形成了原始细胞。此时 RNA 的复制及 RNA 指导的蛋白质合成在一个由膜包绕的相对稳定的环境中进行。

应该指出的是，尽管上述推测的原始细胞和现存的支原体很相似，但支原体和原始细胞不同，其遗传信息储存于 DNA 之内，而不是在 RNA 内。因此在生命进化过程中，储存遗传信息的生物大分子 DNA 的形成在生命体——原始细胞形成之后，在后续的原始细胞的不断进化过程中，在蛋白质的帮助下，由 RNA 指导形成双螺旋 DNA，以 DNA 方式储存的遗传信息更加稳定，而且双链形式还可提供修补的机会。由此，一些学者认为在细胞的起源过程中，RNA 起到承前启后的作用。

二、原核细胞向真核细胞的演化

原始细胞形成以后，依靠其增殖能力在进化过程中逐步获得优势，最终覆盖了地球表面。原始细胞可能是以原始海洋表面的有机物为营养的异养型原始生物。由于地球早期的地表大气层中没有游离氧，所以这类原始细胞只能通过厌氧呼吸获得能量。但是，当原始海洋内的有机物随着异养消耗而减少时，只靠异养就难以生存，因而，在新的条件下，随着原始细胞形态和功能的逐渐分化，最终产生了具有质体功能的蓝藻类的原核生物，使原始生命从异养型发展为自养型。原始细胞中出现了包围细胞的细胞膜、储存遗传信息的 DNA、指导蛋白质合成的 RNA 和制造蛋白质的核糖体，是原核细胞诞生的标志。

一般认为，真核细胞是由原核细胞进化而来的，原始真核细胞大约在 15 亿年前在地球上出现。关于真核细胞如何从原核细胞进化而来，目前有两种假说：

1. 分化起源说　该学说认为，原核生物在长期的自然演化过程中，通过内部结构的分化和自然选择，逐步形成网膜系统、胞核系统和能量转换系统等，使其成为结构日趋精

细，功能更加完善的真核细胞，最终形成真核生物。

2. 内共生起源说　该学说认为，真核细胞是由原始厌氧菌的后代吞入了需氧菌逐步演化而来，进而使真核细胞能在氧气充足的地球上生存下来。

氧与代谢的关系在细胞进化过程中起重要作用。原始地球的大气中不存在氧，古代原核细胞的代谢途径只能在无氧条件下进行，事实上在现存的绝大多数生物中，依然保留着进化过程中保存下来的糖的无氧分解（酵解）代谢。当合成的原始有机物被耗尽时，那些能够利用大气中的二氧化碳和氮来合成有机物的细胞，便会在自然选择中存活下来。这样的细胞在合成有机物如进行光合作用时，同时把氧作为代谢产物释放到大气中。因此认为，大气中出现氧是在生物已能进行光合作用之后的事。随着光合作用的出现，大气中的氧含量不断增高，以致成为许多早期生物的有害物质（比如对厌氧菌）。但通过自然选择，有些细胞可进化为能够利用氧来进行代谢反应。随着大气中的氧不断积累，有些厌氧菌则逐渐被淘汰，而另一些厌氧菌则与需氧型细胞结合在一起营共生生活，并逐渐形成了最早的真核细胞。

这样的真核细胞的出现，使代谢反应趋于复杂化，需要更多的膜表面来进行各种代谢反应，为此，在进化过程中为增加膜的表面积，细胞膜逐渐内陷并形成了各种各样的细胞器。细胞核等细胞器的出现是真核细胞区别于原核细胞的主要特征。

三、单细胞生物向多细胞生物的进化

生命进化的另一个重要步骤是由单细胞进化出现了多细胞生物。早期的真核生物均为单细胞生物，直到若干亿年后，出现了多细胞生物，然后分化成各种各样的植物和动物，最后人类从动物界分化出来。最早的多细胞生物化石距今已有近 7 亿年。

多细胞生物进化的早期可能是由单细胞聚集成群体。例如，粘细菌通常以单细胞阿米巴方式活动，以吞噬细菌为生，在遇到饥饿的情况下，单个细胞聚集起来，形成蛞蝓状的多细胞个体，并能进一步分化为基部、孢子梗、孢子囊等几个部分，以更有效的适应周围环境。孢子囊中每个孢子在适宜条件下可发展成一个阿米巴单细胞个体。

细胞在向多细胞机体进化过程中，另一个最重要的特点是出现细胞的分化，即在多细胞的机体内，各种细胞朝不同方向发展，形成结构和功能各异的不同组织，但又互相协调成为一个有机的整体。现存的团藻可能反映出较早出现的多细胞生物的某些特征。团藻实际上是单个细胞经过多次分裂，后代仍聚在一团未曾分开而成的个体，但是在这团细胞中，已有一定的分工，有的细胞特化其运动功能，有的细胞特化其光合作用功能（产生能量），有的细胞特化其有性生殖功能。在高等动物细胞中清楚可辨的特化细胞有 200 多种，这些特化细胞构成了不同的细胞系统。

第三节　细胞的分子基础

组成细胞的物质称为原生质（protoplasm），不同细胞的原生质在化学成分上虽有差异，但其化学元素基本相同。原生质的化学元素有 50 多种，其中主要的是 C、H、O、N 四种元素，其次为 S、P、Cl、K、Na、Ca、Mg、Fe 等元素，这 12 种元素约占细胞总量的 99.9%以上（前 4 种约占 90%）。此外，在细胞中还含有数量极少的微量元素，如 Cu、Zn、Mn、Mo、Co、Cr、Si、F、Br、I、Li、Ba 等。这些元素并非单独存在，而是相互结合，以无机化合物和有机化合物形式存在于细胞中。有机化合物是组成细胞的基本成分，包括有机小分子和生物大分子。

一、生物小分子

（一）水和无机盐是细胞内的无机化合物

无机化合物包括水和无机盐。水是细胞中含量最多的一种成分，是良好的溶剂，细胞内各种代谢反应都是在水溶液中进行的。细胞中的水除以游离形式存在之外，还能以氢键与蛋白质分子结合，成为结合水，构成细胞结构的组成部分。无机盐在细胞中均以离子状态存在，阳离子如 Na^+、K^+、Ca^{2+}、Fe^{2+}、Mg^{2+}等，阴离子有 Cl^-、SO_4^{2-}、PO_4^{3-}、HCO_3^- 等。这些无机离子中，有的游离于水中，维持细胞内外液的渗透压和 pH，以保障细胞的正常生理活动；有的直接与蛋白质或脂类结合，组成具有一定功能的结合蛋白（如血红蛋白）或类脂（如磷脂）。

（二）有机小分子是组成生物大分子的亚单位

有机小分子是分子量在 100~1 000 范围内的碳化合物，分子中的碳原子可多达 30 个左右。细胞中含有 4 种主要的有机小分子：单糖（monosacharide）、脂肪酸（fatty acid）、氨基酸（amino acid）和核苷酸（nucleotide）。糖主要由碳、氢、氧三种元素组成，其化学组成为 $(CH_2O)_n$，其中 n 通常等于 3、4、5、6 或 7，故又称碳水化合物（carbohydrate），是细胞的能源和多糖的亚基；脂肪酸分子由两个不同的部分组成，一端是疏水性的长烃链，另一端是亲水性的羧基（—COOH），其衍生物如磷脂由一个以 2 条脂肪酸链组成的疏水的尾和一个亲水性的头组成，它们是细胞膜的组分；氨基酸是一类多样化的分子，但均有一个共同的特点，都有一个羧基和一个氨基，两者均与同一个 α 碳原子连接，它们是蛋白质的亚基；核苷酸分子由一个含氮环的化合物与一个五碳糖相连而成，这个糖是含有多个磷酸基团的核糖或脱氧核糖，核苷酸是核酸的亚基。

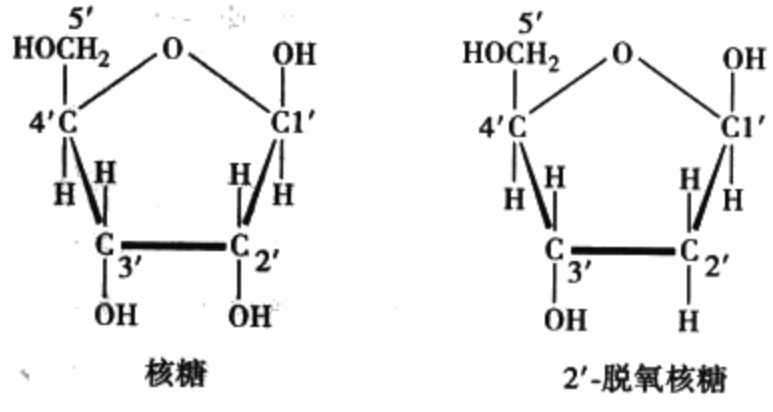
二、生物大分子

生物大分子是由有机小分子构成的，细胞的大部分物质是大分子，大约有 3 000 种大分子，分子量从 10 000 到 1000 000。细胞内小分子组装成大分子，不仅仅是分子大小的变化，而且赋予了大分子与小分子截然不同的生物学特性。细胞内主要的大分子有核酸、蛋白质和多糖，其分子结构复杂，在细胞内各自执行其独特的功能。

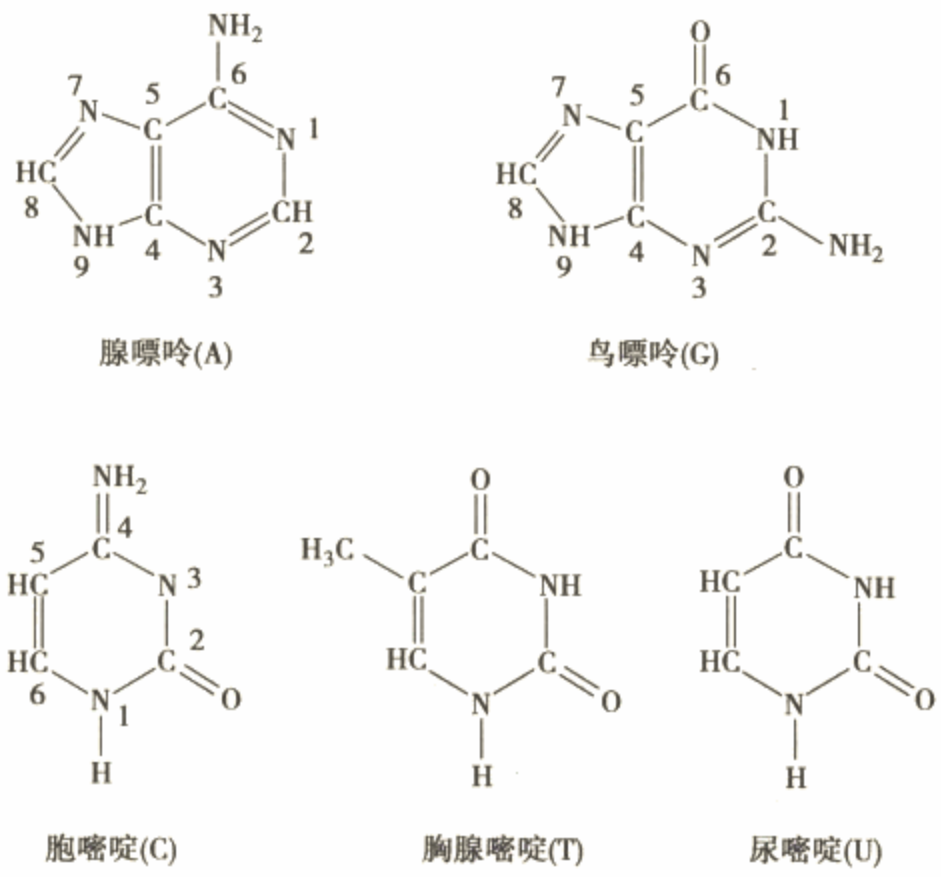
（一）核酸携带遗传信息

核酸（nucleic acid）是生物遗传的物质基础，目前已知的所有生物，包括病毒、细菌、真菌、植物、动物及人体细胞中均含有核酸。核酸与生物的生长、发育、繁殖、遗传和变异的关系极为密切。细胞内的核酸分为核糖核酸（ribonucleic acid，RNA）和脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid，DNA）两大类。其中 DNA 携带着控制细胞生命活动的全部信息，RNA 则与信息的表达相关。

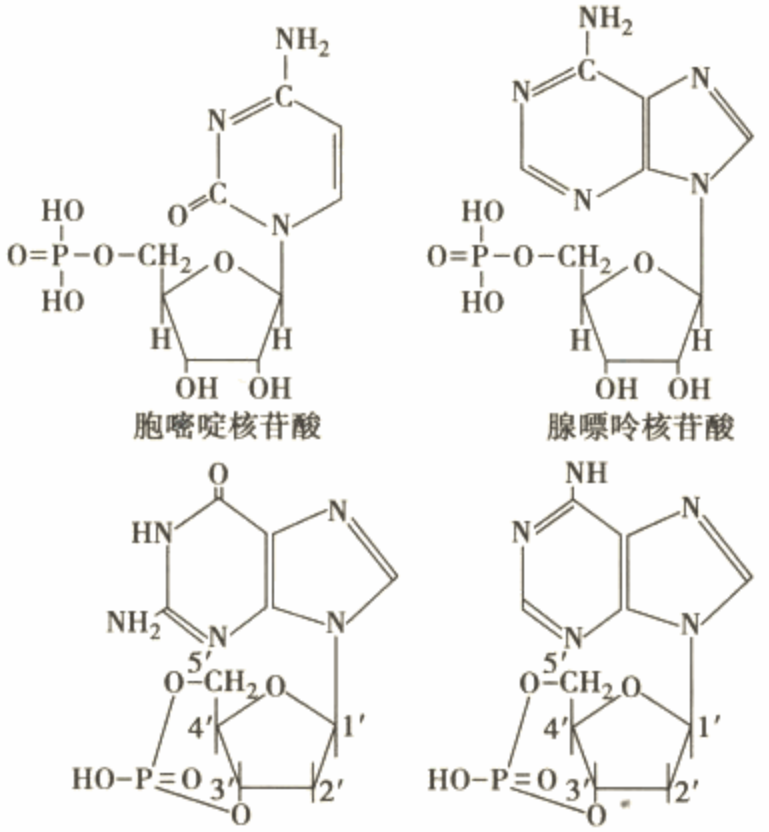
1. 核酸的化学组成　核酸由几十个乃至几百万个单核苷酸聚合而成，因此核苷酸是核酸的基本组成单位。核苷酸由戊糖、碱基（含氮有机碱）和磷酸三部分组成。戊糖有两种，即 D-核糖和 D-2-脱氧核糖（图 2-5）。碱基也有两类：嘌呤和嘧啶。嘌呤有腺嘌呤(adenine，A）和鸟嘌呤（guanine，G）；嘧啶有胞嘧啶（cytosine，C）、胸腺嘧啶(thymine，T)和尿嘧啶（uracil，U）（图 2-6）。除此之外，在DNA



●图 2-5　DNA 和 RNA 分子中戊糖的结构式



● 图 2-6　常见嘌呤和嘧啶的结构式



● 图 2-7　单核苷酸的结构式

和 RNA 分子中还发现有一些修饰碱基，即在碱基的某些位置附加或取代某些基团，如 6-甲基嘌呤、5-甲基胞嘧啶和 5-羟基胞嘧啶等，因它们的含量很少，又称稀有碱基。绝大部分稀有碱基分布在RNA 分子上。

核苷酸的产生过程是首先形成核苷。核苷由碱基与核糖或脱氧核糖缩合而成。核糖的第 1 位碳原子与嘧啶第 1 位氮原子或与嘌呤第 9 位氮原子形成 N—C 键，即糖苷键。由于核糖有两种，因此核苷又分为核糖核苷（简称核苷）及脱氧核糖核苷（简称脱氧核苷）。核苷的戊糖羟基与磷酸形成酯键，即成为核苷酸。一般生物体内存在的大多是 5′-核苷酸，即磷酸与核糖第 5 位上羟基形成酯键，如腺苷酸（AMP）、鸟苷酸（GMP）、胞苷酸(CMP)、尿苷酸(UMP)，以及脱氧腺苷酸（dAMP）、脱氧鸟苷酸（dGMP）、脱氧胞苷酸(dCMP)、脱氧胸苷酸（dTMP）。此外，有时磷酸可同时与核苷上 2 个羟基形成酯键，这就形成了环化核苷酸。常见的有 3′,5′-环化腺苷酸(3′,5′-cyclic adenylic acid，cAMP）和 3′,5′-环化鸟苷酸（3′,5′-cyclic guanylic acid，cGMP）（图 2-7）。

核酸由大量的单核苷酸聚合而成，单核苷酸间的连接方式为：一个核苷酸中戊糖的5′碳原子上连接的磷酸基以酯键与另一个核苷酸戊糖的 3′碳原子相连，而后者戊糖的 5′碳原子上的磷酸基又以酯键再与另一个核苷酸戊糖的 3′碳原子相连，由此通过3′,5′磷酸二酯键重复相连而形成的多聚核苷酸链即为核酸（图 2-8）。表 2-3 列出了 DNA 和 RNA 在化学组成上的异同。从化学组成上看，DNA 可视为由脱氧核苷酸线性排列组成（RNA 则由核糖核苷酸线性排列组成），由于各种脱氧核苷酸中脱氧

表 2-3　DNA 和 RNA 在化学组成上的异同

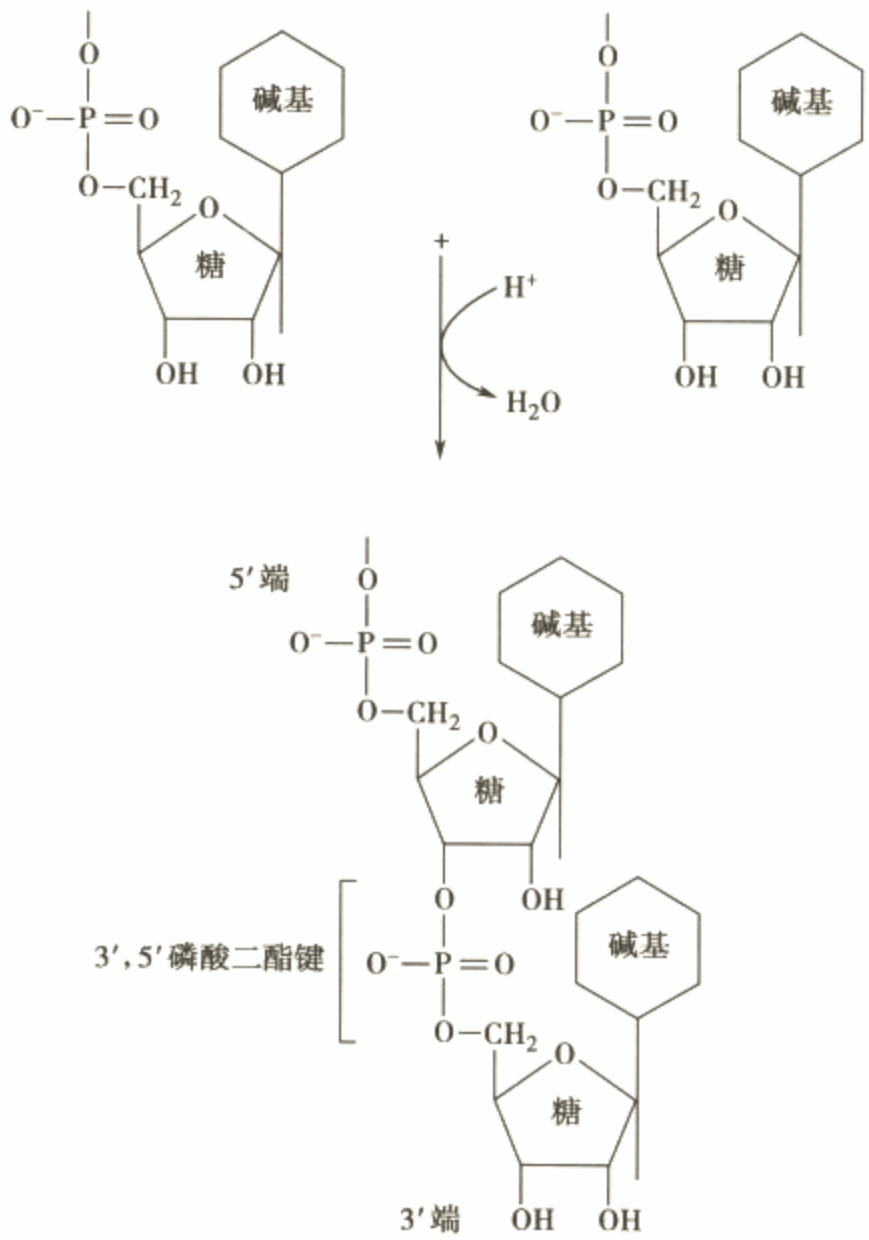
	DNA	RNA		DNA	RNA
戊糖	脱氧核糖	核糖	核苷酸	脱氧腺苷酸(dAMP)	腺苷酸(AMP)
碱基	腺嘌呤(A)鸟嘌呤(G)	腺嘌呤(A)鸟嘌呤(G)		脱氧鸟苷酸(dGMP)	鸟苷酸(GMP)
	胞嘧啶(C)胸腺嘧啶(T)	胞嘧啶(C)尿嘧啶(U)		脱氧胞苷酸(dCMP)	胞苷酸(CMP)
磷酸	磷酸	磷酸		脱氧胸苷酸(dTMP)	尿苷酸(UMP)

核糖和磷酸都是相同的，只有碱基是不同的，因此，可用碱基的排列顺序来代表 DNA 的脱氧核苷酸组成顺序。DNA 分子中的脱氧核苷酸或碱基的排列顺序也称 DNA 的一级结构。

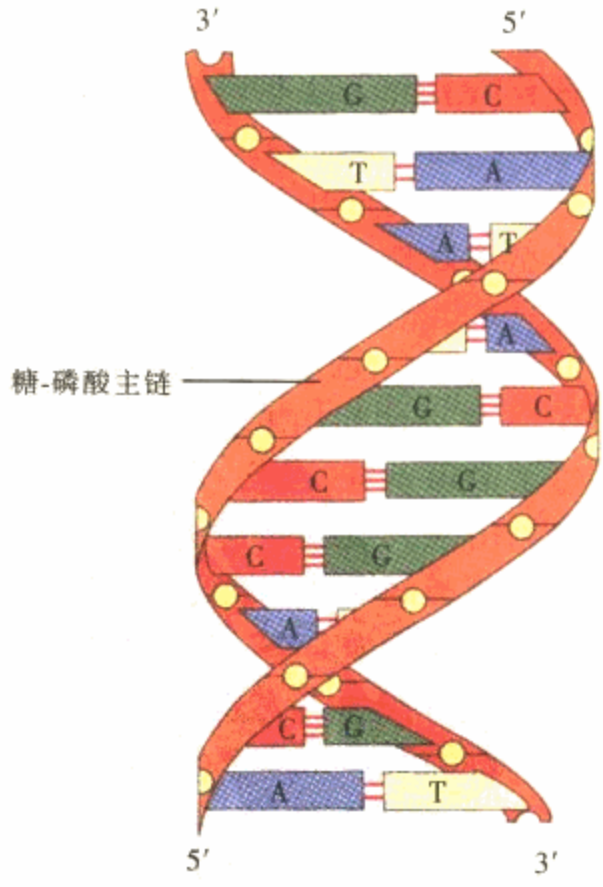
2. DNA　20 世纪 50 年代初，有关 DNA 样品的 X-射线衍射分析结果提示，DNA 分子是由两条链组成的螺旋状多聚体。对来源于不同生物细胞的 DNA 分子的碱基含量进行分析，证明 [A] = [T]，[C] = [G]（[ ] 表示摩尔浓度）。1953 年 Watson 和 Crick 提出了 DNA 分子的双螺旋结构模型（图 2-9），该模型认为，DNA 分子由两条相互平行而方向相反的多核苷酸链组成，即一条链中磷酸二酯键连接的核苷酸方向是 5′→3′，另一条是 3′→5′，两条链围绕着同一个中心轴以右手方向盘绕成双螺旋结构。螺旋的主链由位于外侧的间隔相连的脱氧核糖和磷酸组成，双螺旋的内侧由碱基构成，即一条链上的 A 通过两个氢键与另一条链上的 T 相连，一条链上的 G 通过三个氢键与另一条链上的 C 相连，或者说 A 总是与 T 配对，G 总是与 C 配对，这种碱基间的配对方式称为碱基互补原则。螺旋内每一对碱基均位于同一平面上，并且垂直于螺旋纵轴，相邻碱基对之间距离为 0.34nm，双螺旋螺距为 3.4nm。构成 DNA 分子的两条链称为互补链。由于组成 DNA 的两条链是互补的，即 A═T、C ≡ G，因此，如果知道一条链中的碱基排列顺序，依据碱基互补原则，便可知道另一条链上的碱基排列顺序（图 2-10）。

DNA 的双螺旋结构易受环境因素特别是湿度所影响，在低湿度时呈 A 型，高湿度时呈 B 型，分别称为 A-DNA 和 B-DNA，其中 B-DNA 即 Waston-Crick 描述的 DNA 双螺旋结构。A-DNA 所形成的右手螺旋与 B-DNA 不同，比 B-DNA 较大而且较平。此外，还有人发现呈左手螺旋的 DNA，称为 Z-DNA。

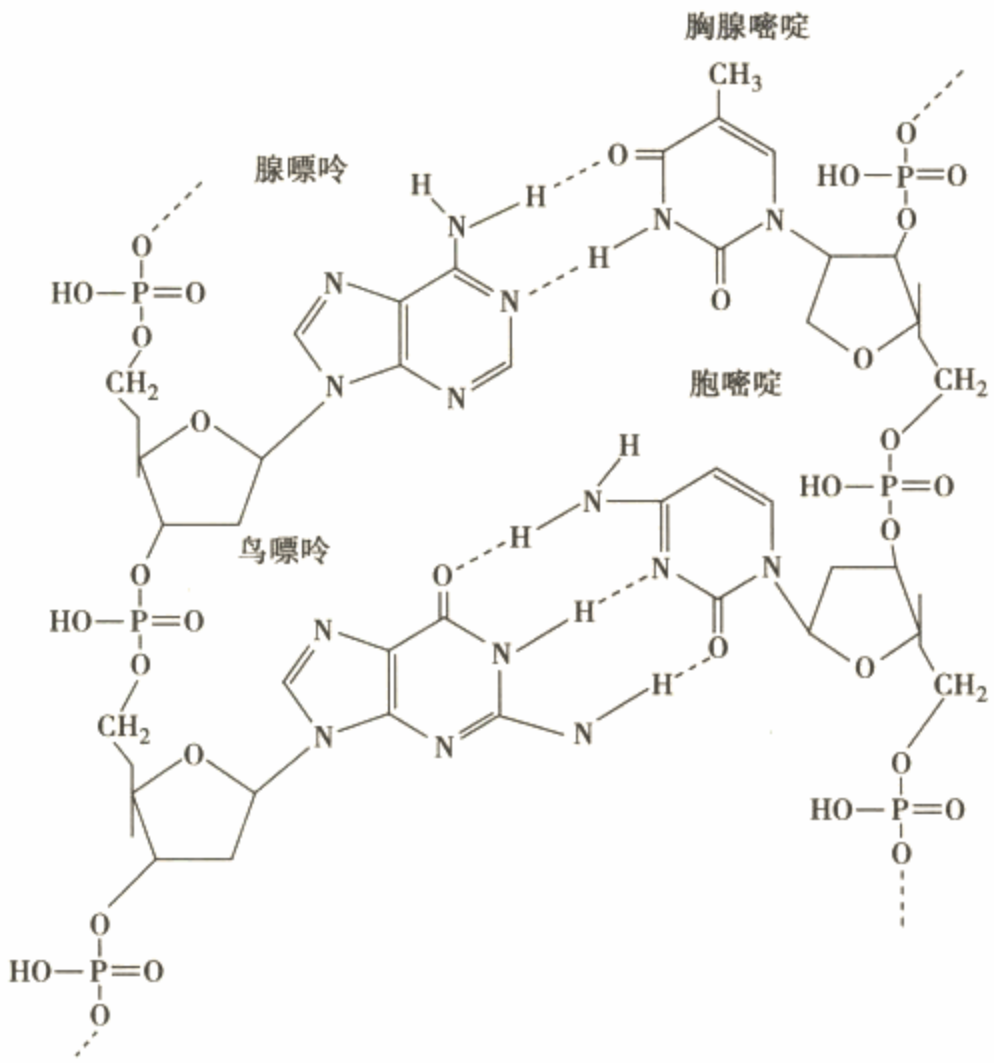
DNA 的主要功能是储存、复制和传递遗传信息。在组成 DNA 分子的线性核苷酸序列中蕴藏着大量的遗传信息。虽然 DNA 分子中只有四种核苷酸，但核苷酸的数量却非常巨大且呈随机排列，这就决定了 DNA 分子的复杂性和多样性。如果一个 DNA 分子由 n 个核苷酸组成，则其可能的排列顺序为 4^n。如此多的排列顺序展示了遗传信息的多样性，也即生物种类的多样性。



●图 2-8　多核苷酸间的磷酸二酯键



●图 2-9　DNA 双螺旋结构模式图



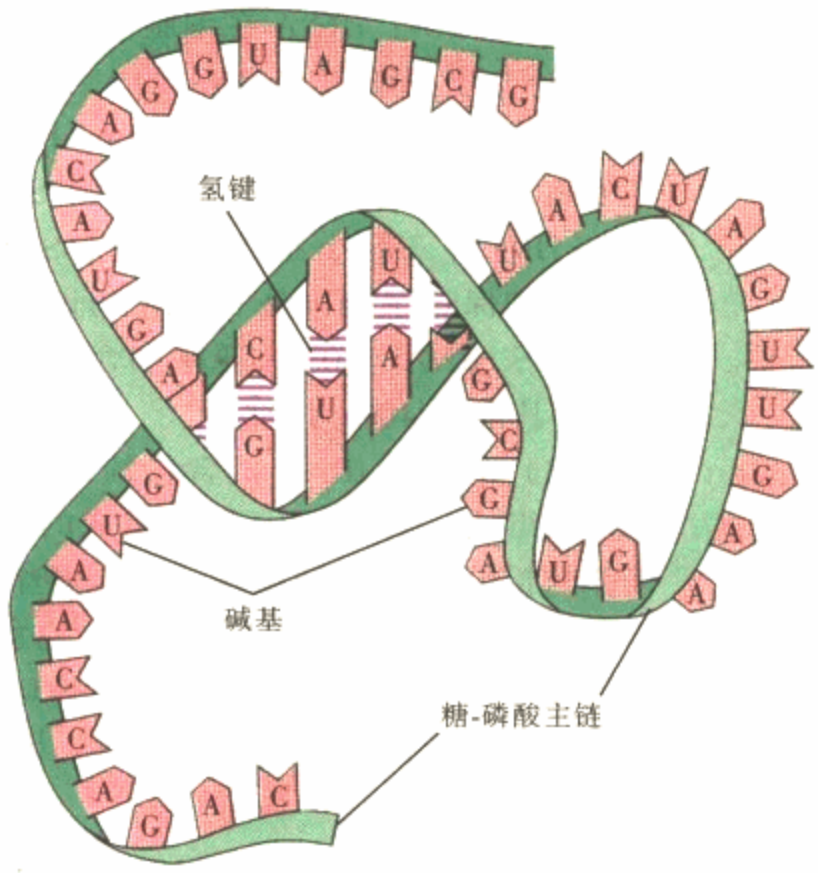
● 图 2-10　DNA 分子化学结构的一部分

细胞或生物体的一套完整的单倍体遗传物质称为基因组，它是所有染色体上全部基因和基因间的 DNA 的总和。迄今包括人类在内的多个生物的 DNA 序列分析已经完成，人类基因组 DNA 含有的碱基数为 2.91×10^6~3.2×10^6kb（3×10^9bp），其中：（A+T）和（G+C）分别占 54%和 38%；编码蛋白质序列（外显子）占 DNA 的 1.1%~1.4%，内含子序列占 24%，基因间序列占 75%；基因的数目约 2 万~3 万个，每个基因的长度平均为 2~30kb，其中功能未知的占 60%以上；DNA 中含有大量的重复序列，约占 50%以上；每个人约有 0.1%的核苷酸差异。这些研究结果为人们深入认识 DNA 的结构和功能，以及 DNA 与生物的起源、进化以及生物多样性之间的关系积累了丰富的资料。

DNA 分子中所携带的遗传信息传递给后代细胞靠 DNA 复制来实现，DNA 双螺旋结构模型很好地解释了这一信息传递过程的普遍机制。组成双螺旋 DNA 的两条链是互补的，每一条链都含有与其互补链精确配对的碱基序列，因此，两条链中的每一条都可以携带相同的信息。DNA 复制从两条互补的 DNA 链局部分离（分叉）开始，以每条链为模板，在 DNA 聚合酶作用下将脱氧核糖核苷酸加在 DNA 链的 3′末端，所加上去的核苷酸是与模板链上的碱基互补的，从而产生与模板链序列互补的 DNA 子链。如此，可将遗传信息全盘复制出来，最终形成完整的 DNA 分子。新形成的双链 DNA 分子在核苷酸或碱基序列上与充当模板的亲代 DNA 分子完全相同，由于每条亲代 DNA 单链成为子代 DNA 双链中的一条链，故称为 DNA 半保留复制（semiconservative replication）。

DNA 分子所携带的遗传信息的流向是先形成 RNA，这种以 DNA 为模板合成 RNA 的过程称为转录（transcription）。DNA 转录和 DNA 复制不同，它以一条链的特定部分为模板合成一条互补的 RNA 链，在 RNA 合成之后，DNA 重新形成双螺旋结构，并释放出 RNA 分子，然后，形成的 RNA 被翻译成体现遗传信息的蛋白质，后者决定细胞的生物学行为。

3. RNA　DNA 转录来的 RNA 分子也是由四种核苷酸通过 3′，5′磷酸二酯键连接而成的。组成 RNA 的四种核苷酸为腺苷酸、鸟苷酸、胞苷酸和尿苷酸，与 DNA 分子的区别仅在于 RNA 中的尿嘧啶替代了 DNA 中的胸腺嘧啶。此外，RNA 分子中的戊糖是核糖，而不是脱氧核糖。大部分 RNA 分子以单链形式存在，但在 RNA 分子内的某些区域，RNA 单链仍可折叠，并按碱基互补原则形成局部双螺旋结构，这种双螺旋结构呈发夹样，也称为 RNA 的发夹结构（图 2-11）。RNA 的结构和功能的研究是近些年来飞速发展的领域，新的 RNA 被不断地发现，表 2-4 总结了动物细胞内主要的 RNA 种类。



●图 2-11　RNA 发夹结构模式图

（1）mRNA：mRNA 约占细胞内总 RNA 的 1%~5%。其含量虽少，但种类甚多而且极不均一，例如每个哺乳类动物细胞可含有数千种大小不同的 mRNA。原核细胞与真核细胞的 mRNA 不同，比如，原核细胞没有真核细胞 mRNA 所特有的 5′端 7-甲基三磷酸鸟苷（$m^7G^{5'}ppp$）帽子结构，也没有 3′端的由 30~300 个腺苷酸组成的多聚腺苷酸尾巴（3′polyadenylate tail，PolyA）结构。在高等真核生物，不同组织细胞中 mRNA 的种类相差极大。mRNA 在遗传信息流向过程中起重要作用，即携带着来源于 DNA 遗传信息的mRNA 与核糖体结合，作为合成蛋白质的模板。mRNA 分子中每三个相邻的碱基组成一个密码子（codon），由密码子确定蛋白质中氨基酸的排列顺序。因此，整个 mRNA 链即是由一个串联排列的密码子组成。

mRNA 指导特定蛋白质合成的过程称为翻译（translation）。在原核生物，mRNA 在合成的同时可直接翻译为蛋白质，而真核细胞则不同，其 mRNA 在合成之后需经过一系列的加工，然后才能成为合成蛋白质的模板。

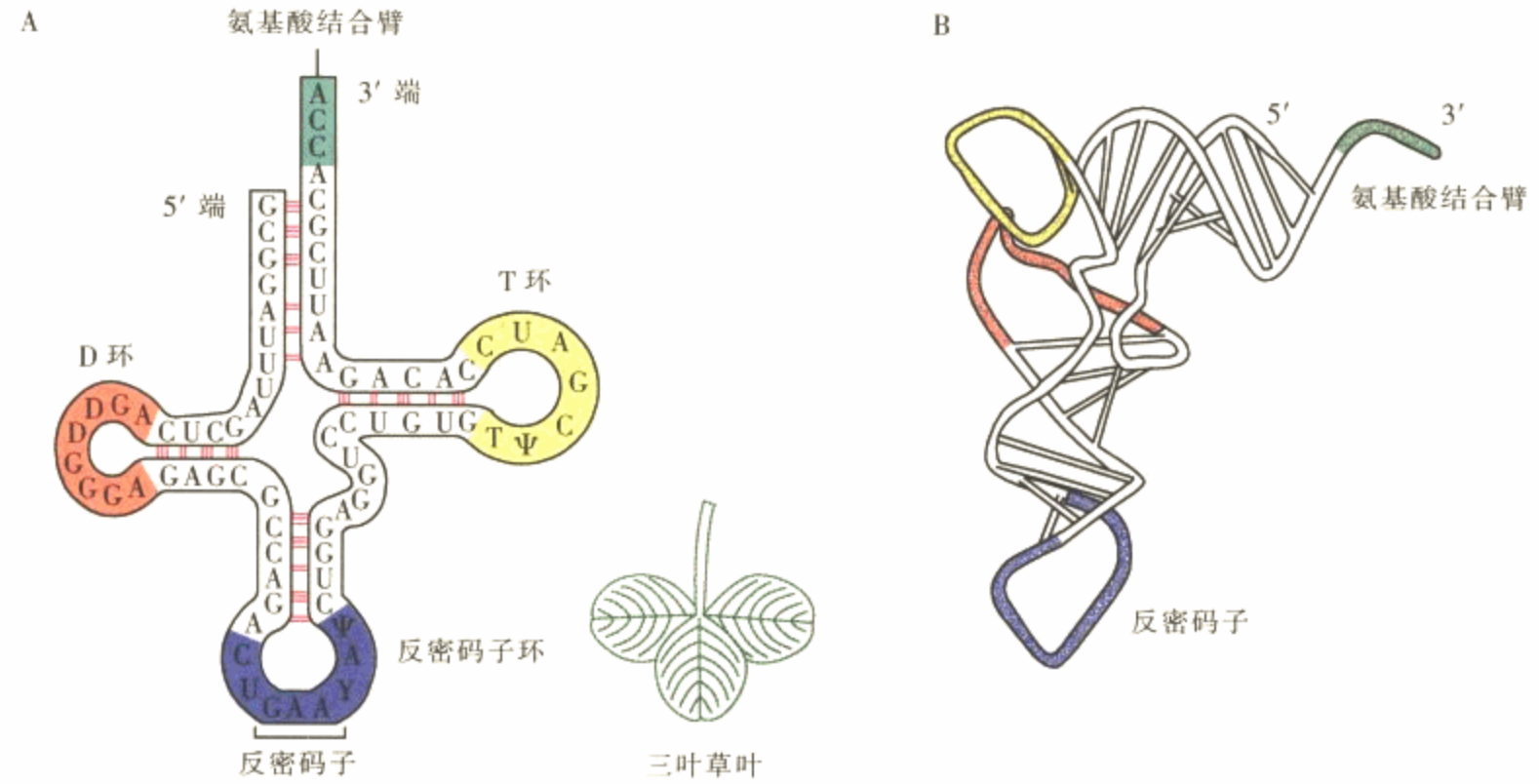
原核细胞的 mRNA 为多顺反子（polycistron），即一分子 RNA 有时可携带几种蛋白质的遗传信息，能指导合成几种蛋白质，而真核细胞中的 mRNA 是单顺反子（monocistron），每分子 RNA 只携带一种蛋白质遗传信息，只能作为一种蛋白质合成的模板。此外，不论是原核细胞的多顺反子 mRNA，还是真核细胞的单顺反子 mRNA，在其 5′端和 3′端都各有一段由 30 到数百个核苷酸组成的非翻译区（untranslated region，UTR），中间则是具有编码蛋白质功能的编码区（coding region）。UTR 是蛋白质翻译调控的重要靶点之一。

表 2-4　动物细胞内主要含有的 RNA 种类及功能

RNA 种类	存 在 部 位	功　能
信使 RNA(mRNA)	细胞核与细胞质,线粒体(mt mRNA)	蛋白质合成模板
核糖体 RNA(rRNA)	细胞核与细胞质,线粒体(mt rRNA)	核糖体的组成成分
转运 RNA(tRNA)	细胞核与细胞质,线粒体(mt tRNA)	转运氨基酸,参与蛋白质合成
小核 RNA(snRNA)	细胞核	参与 mRNA 前体的剪接、加工
小核仁 RNA(snoRNA)	细胞核	参与 rRNA 的加工与修饰
微小 RNA(miRNA)	细胞核与细胞质	基因表达调节
核酶(有酶活性的 RNA)	细胞核与细胞质	催化 RNA 剪接

（2）rRNA：rRNA 在细胞中的含量较丰富，约占 RNA 总量的 80%~90%，其分子量在三种 RNA 中也最大。rRNA 的大小一般用沉降系数 S 表示。rRNA 通常也呈单链结构，其主要功能是参与核糖体（ribosome）的形成。核糖体是合成蛋白质的机器，由大小两个亚基组成，在原核生物中核糖体为 70S，其大小亚基分别为 50S 和 30S，50S 大亚基中含 23S 和 5S rRNA，30S 小亚基中含有 16S rRNA。在 16S rRNA 的 3′端有一个与 mRNA 翻译起始区互补的保守序列，是 mRNA 的识别结合位点。而真核生物的核糖体为 80S，40S 的小亚基含 18S rRNA，60S 大亚基则含有 28S、5.8S 和 5S 三种 rRNA。rRNA 约占核糖体总量的 60%，其余的 40%为蛋白质。

（3）tRNA：tRNA 的含量约占细胞总 RNA 的 5%~10%，其分子较小，由 70 到 90 个核苷酸组成。tRNA 分子化学组成的最大特点是含有稀有碱基。tRNA 分子为单链结构，但有部分折叠成假双链结构，以至整个分子结构呈三叶草形（图 2-12）：靠近柄部的一端，即游离的 3′端有 CCA 三个碱基，它能以共价键与特定氨基酸结合；与柄部相对应的另一端呈球形，称为反密码环，反密码环上的三个碱基组成反密码子（anticodon），反密码子能够与 mRNA 上密码子互补结合，因此每种 tRNA 只能转运一种特定的氨基酸，参与蛋白质合成。



●图 2-12　tRNA 的三叶草形结构

A. tRNA 三叶草形结构模式图　B. tRNA 分子空间结构模式图

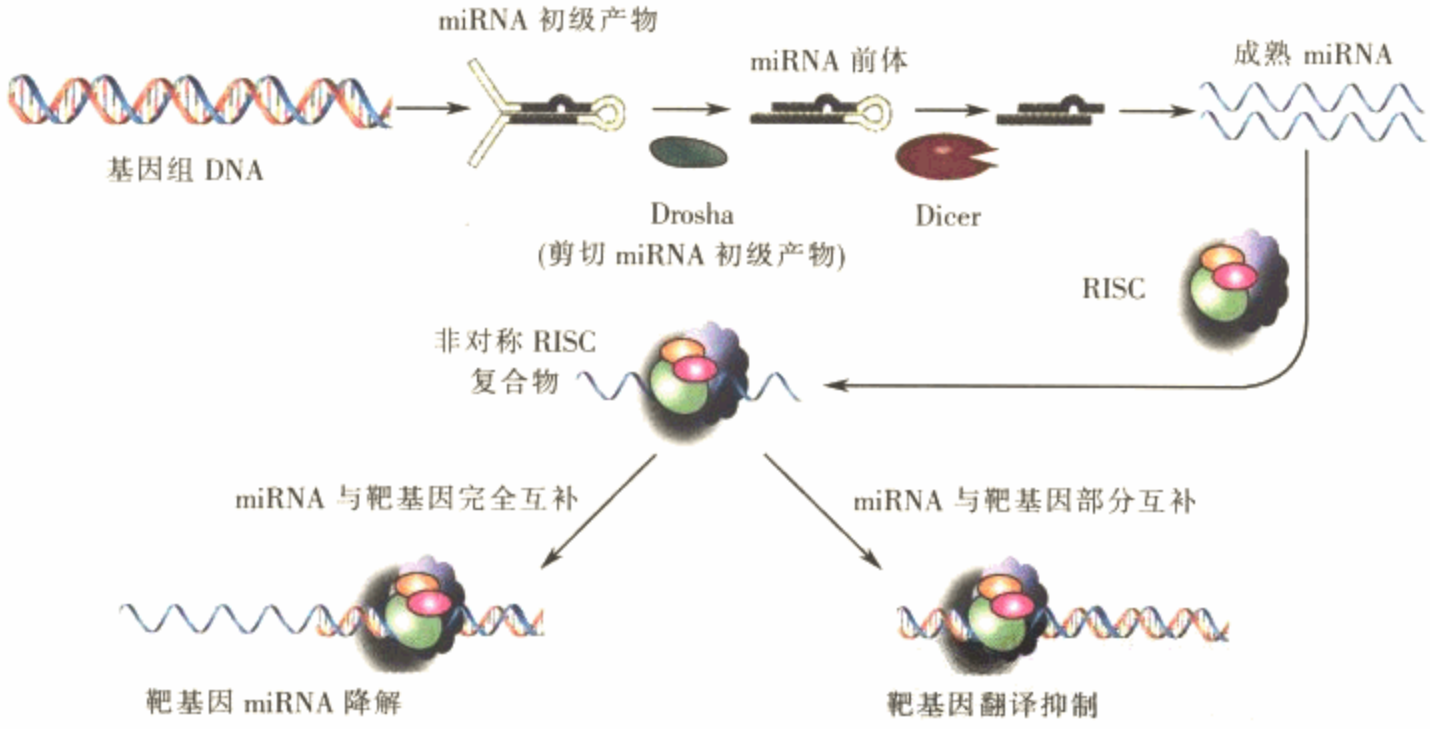
近些年研究发现，tRNA 还可以作为反转录时的引物。当反转录病毒在宿主细胞内复制时，需要细胞内的 tRNA 为引物，反转录成与其互补的 DNA 链（cDNA）。可以作为引物的常见 tRNA 是色氨酸-tRNA、脯氨酸-tRNA。

（4）snRNA：在真核细胞的细胞核中存在一类独特的 RNA，它们的分子相对较小，约含 70~300 个核苷酸，故被称为小核 RNA（small nuclear RNA，snRNA）。snRNA 在细胞内的含量虽不及总 RNA 的 1%，但其拷贝（copy）数多得惊人，如 Hela 细胞的 snRNA 分子可达 100 万~200 万个。现已发现的 snRNA 至少有 20 多种，其中有 10 多种分子中都富含尿苷酸（U），且含量可高达总核苷酸的 35%，故这些 snRNA 也称为 U-snRNA。U-snRNA 的一级结构也是单股多核苷酸链，二级结构中也含若干个发夹式结构。U-snRNA 分子中还含有少量的甲基化稀有碱基，并且都集中在多核苷酸链的 5′端，形成 U-snRNA 5′端特有

的帽子结构，常见的为 2,2,7-三甲基三磷酸鸟苷（$m_3^{2,2,7}$ Gppp）。U-snRNA 的主要功能是参与基因转录产物的加工过程，在该过程中 U-snRNA 与一些特异蛋白结合成剪接体 UsnRNP（small nuclear ribonucleoprotein particle）。

（5）miRNA：微小 RNA（microRNA，miRNA）是一类长约 21~25nt 的非编码 RNA，其前体为 70~90nt，具有发夹结构（即茎环结构）。miRNA 最先在研究秀丽隐小杆线虫（*C. elegan*）的发育过程中发现，后来一个个新的 miRNA 在高等哺乳动物中不断被发现。越来越多的研究资料显示，哺乳动物基因的近 1%可能编码 miRNA。目前文献上通常以 miR-# 表示 miRNA，其中 miR 表示 miRNA，“#”代表其序号，用斜体的 mir-# 来表示其相应的基因，例如，在造血组织细胞中发现的小 RNA 是 miR-181，则表达该小 RNA 的基因记作 *miR-181*。miRNA 普遍存在于生物界，具有高度的保守性。

miRNA 的形成与作用机制是：在细胞核内编码 miRNA 的基因转录成 miRNA 初级产物（pri-miRNA），在 Drosha（RNaseⅢ家族的成员）的作用下，剪切为约 70~90 个核苷酸长度、具有茎环结构的 miRNA 前体（pre-miRNA）。miRNA 前体在细胞核-细胞质转运蛋白的作用下，从核内运输到胞质中。然后，在 Dicer 酶（双链 RNA 专一性 RNA 内切酶）的作用下，miRNA 前体被剪切成 21~25 个核苷酸长度的成熟双链 miRNA。起初，成熟 miRNA 与其互补序列互相结合成所谓“双螺旋结构”；随后，双螺旋解旋，其中一条结合到RNA 诱导基因沉默复合物（RNA-induced silencing complex，RISC）中，形成非对称 RISC 复合物（asymmetric RISC assembly）。非对称 RISC 复合物通过与靶基因 mRNA 3′端 UTR 互补结合，抑制靶基因的蛋白质合成或促使靶基因的 mRNA 降解，从而参与细胞分化与发育的基因表达调控（图 2-13）。



●图 2-13　miRNA 的形成与作用机制

需要指出的是，Dicer 酶除了在 miRNA 形成过程中起重要作用之外，还可将一些外源双链 RNA 加工成为 22nt 左右的 siRNA（small interference RNA）。同 miRNA 的作用机制类似，这些 siRNA 也能够以序列同源互补的 mRNA 为靶点，通过促使特定基因的 mRNA 降解来高效、特异地阻断体内特定基因表达，这种现象称为 RNA 干扰（RNA interference，RNAi）。RNA 干扰现象的发现具有划时代的意义，它不仅揭示了细胞内基因沉默的机制，而且它还是基因功能分析的有力工具。

（6）核酶：核酶（ribozyme）是具有酶活性的 RNA 分子，由 T. Cech 首次发现。Cech

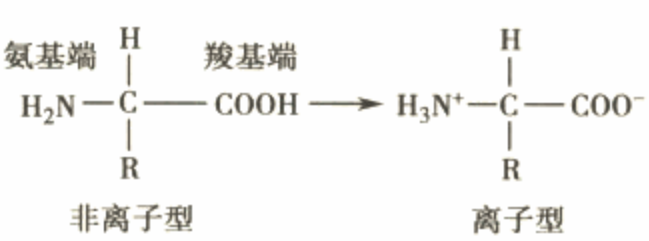
在研究原生动物喜热四膜虫（Tetrahymena thermophila）的 rRNA 剪接时观察到，在除去所有的蛋白质之后，剪接仍可完成。在 rRNA 剪接过程中，前体 rRNA 能释放出一个内含子短链 L19RNA（linear minus 19 intervening sequence，L-19IVS 或 L19RNA），它能以一种高度专一的方式催化寡核苷酸底物的剪接（splicing）。例如，五胞苷酸（C_5）可被 L19RNA 剪接为较长的和较短的寡聚体：C_5 被降解为 C_4 和 C_3，而同时又形成 C_6 和更长的寡聚体。L19RNA 在 C_6 上的作用比在六尿苷酸（U_6）上快得多，而在六腺苷酸（A_6）和六鸟苷酸 G_6 上则一点也不起作用。这说明核酶的高度专一性。此外，核酶还遵循 Michaelis-Menton 酶促反应动力学方程。因此，核酶的发现，对酶的本质就是蛋白质这一传统概念提出了新的挑战，同时也为生命起源问题的探索提出了新的见解。

核酶的底物是 RNA 分子，它们通过与序列特异性的靶 RNA 分子配对而发挥作用。目前已发现了具有催化活性的多种类型的天然核酶，其中锤头状（hammerhead）核酶和发夹状核酶已被人工合成，并显示出很好的功能。人们可以根据锤头结构的模式，去设计能破坏致病基因的转录产物，从而为基因治疗提供新途径。

（二）蛋白质表达遗传信息

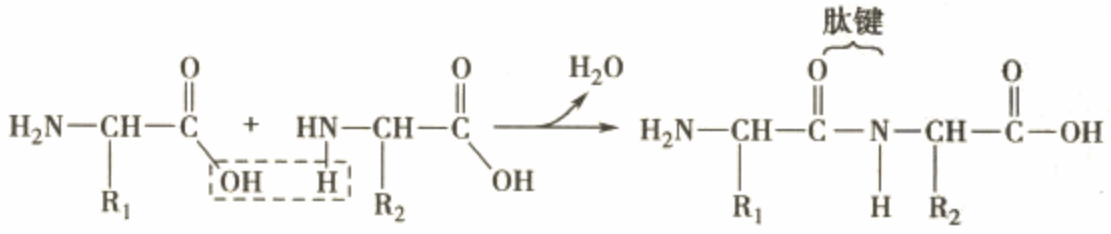
蛋白质（protein）是构成细胞的主要成分，约占细胞干重的 50%以上。蛋白质是展示 DNA 信息的最佳物质，它不仅决定细胞的形状和结构，而且还担负着许多重要的生理功能。自然界中蛋白质的种类繁多，但通常由 20 种氨基酸组成，20 种氨基酸的排列组合以及蛋白质空间构象的形成决定了蛋白质功能的多样性。

1. 蛋白质的组成　蛋白质是高分子化合物，分子量大多在 1 万以上，是由几十个至几百个以上氨基酸组成的多聚体，因此蛋白质组成的基本单位为氨基酸。自然界中有很多种氨基酸，但组成蛋白质的仅有 20 种 L-α-氨基酸，均由 mRNA 上的遗传密码所编辑。氨基酸在结构上的特点是，每一个氨基酸都含有一个碱性的氨基（$—NH_2$）和一个酸性的羧基（—COOH），以及一个结构不同的侧链（—R）（图 2-14）。从氨基酸的结构式可知，氨基酸为两性电解质。按氨基酸侧链—R 的带电性和极性不同，可将氨基酸分为四类：即带负电荷的酸性氨基酸，带正电荷的碱性氨基酸，不带电荷的中性极性氨基酸，以及不带电荷的中性非极性氨基酸。酸性氨基酸有谷氨酸、天冬氨酸；碱性氨基酸有精氨酸、赖氨酸、组氨酸；其余氨基酸则为中性氨基酸。近年研究表明，组成蛋白质的酪氨酸、丝氨酸和苏氨酸的磷酸化与去磷酸化在蛋白质执行信息传递功能过程中起主要作用。



●图 2-14　氨基酸的结构式

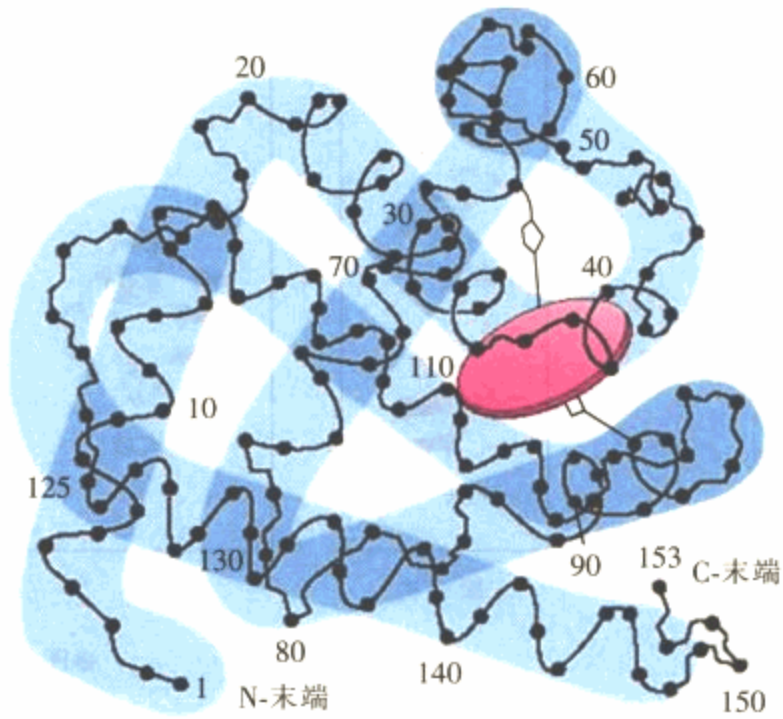
组成蛋白质的各种氨基酸按一定的排列顺序，以一定的化学键——肽键连接而成。肽键是一个氨基酸分子上的羧基与另一个氨基酸分子上的氨基经脱水缩合而成的化学键（图 2-15）。氨基酸通过肽键而连接成的化合物称为肽（peptide），由两个氨基酸连接而成的称为二肽，三个氨基酸连接而成的称为三肽，以多个氨基酸连接而成的称为多肽。多肽链是蛋白质分子的骨架，其中的每个氨基酸称为氨基酸残基，组成蛋白的氨基酸残基的差异体现出蛋白质的特征。因此，20 种氨基酸的不同排列组合顺序反映出蛋白质的结构与功能



●图 2-15　肽键的形成与结构

的多样性。

2. 蛋白质的结构　氨基酸的排列顺序是蛋白质的结构基础，但蛋白质不只是其组成氨基酸的延伸，它是以独特的三维构象（conformation）形式存在的。通过对蛋白质晶体的X-射线衍射图谱分析，可以了解到蛋白质的三维结构。1958 年 John Kendrew 首先确定了由 153 个氨基酸组成的肌红蛋白的三维结构（图 2-16）。迄今已经有数千种蛋白质的三维结构被分析出来。这些蛋白质结构反映出来的共同特征是其多肽链的折叠（folding）。事实上，蛋白质的折叠与核糖体上蛋白质的合成同步进行，即边合成边折叠，新生肽链在合成过程中结构不断发生调整，合成、延伸、折叠、构象调整，直至最后三维结构的形成。除一类可溶性蛋白分子伴侣（molecular chaperone）参与辅助或陪伴蛋白质的折叠之外，蛋白质三维构象的形成主要由其氨基酸的顺序决定，是其氨基酸组分间相互作用的结果。



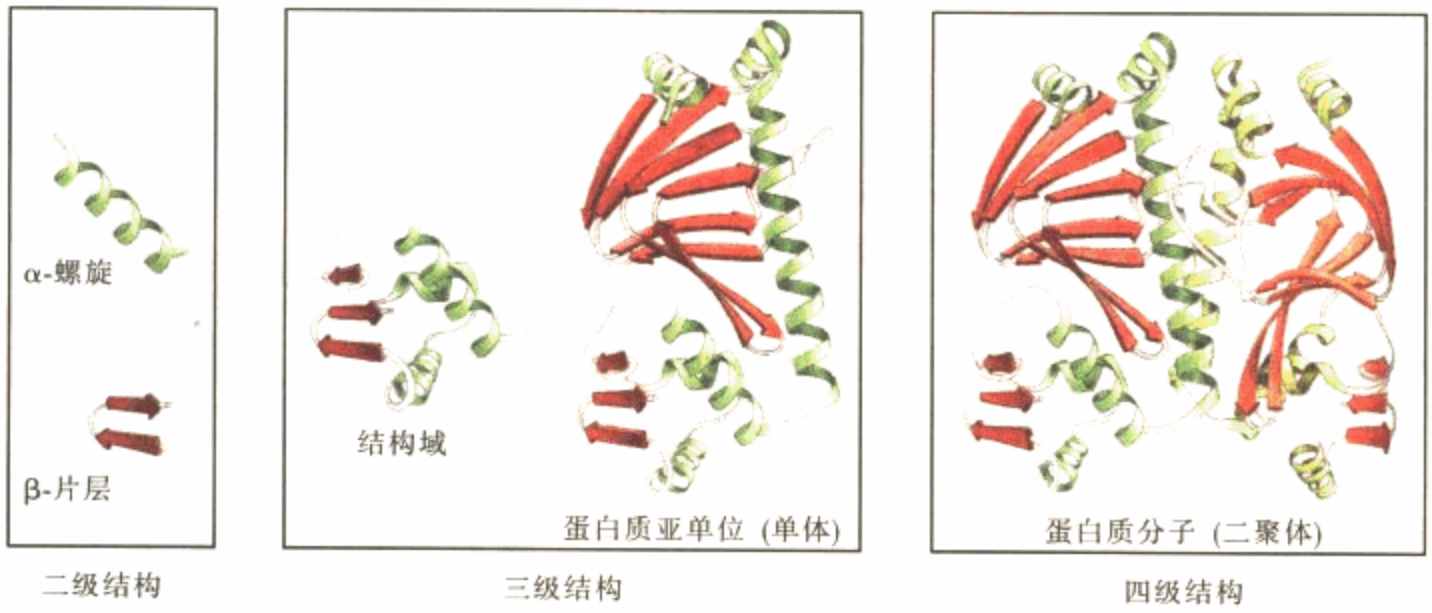
●图 2-16　肌红蛋白的三维结构

根据蛋白质的折叠程度不同，通常将蛋白质的分子结构分为四级，即蛋白质的一级结构、蛋白质的二级结构、蛋白质的三级结构和蛋白质的四级结构。蛋白质的一级结构是指蛋白质分子中氨基酸的排列顺序。一级结构中氨基酸排列顺序的差异使蛋白质折叠成不同的高级结构。

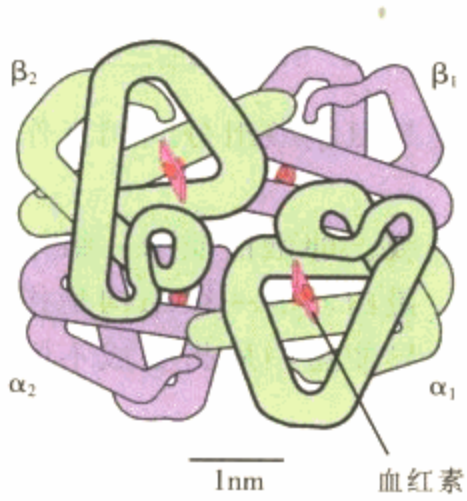
大部分蛋白质分子结构中往往有两种主要的折叠形式，即 α-螺旋（α-helix）和 β-片层（β-sheet）结构，这两种结构被认为是蛋白质的二级结构。二级结构是在蛋白质一级结构基础上形成的，是由于肽链主链内的氨基酸残基之间有规则地形成氢键相互作用的结果。在 α-螺旋中，多肽链沿着螺旋轨道盘旋，每 3.6 个氨基酸盘旋一周，相邻的两个螺旋之间借肽键的亚氨基（>N—H）的氢原子与羰基（>C═O）的氧原子间形成氢键，氢键与螺旋长轴平行。细胞内的多肽在合成之后可自发地形成 α-螺旋，α-螺旋是多肽链最稳定的构象，主要存在于球状蛋白分子中，如肌红蛋白分子中约有 75%的肽链呈 α-螺旋。在 β-片层结构中，多肽链分子处于伸展状态，多肽链来回折叠，呈反向平行，相邻肽段肽键之间形成的氢键，使多肽链牢固结合在一起。β-片层结构主要存在于纤维状蛋白如角蛋白中，但在大部分蛋白质中这两种结构同时存在。

多肽链在二级结构的基础之上进一步折叠，形成蛋白质的三级结构。三级结构是由不同侧链间相互作用形成的，相互作用的方式有氢键、离子键和疏水键等。具有三级结构的蛋白即表现出生物学活性，但某些蛋白质的结构较复杂，由一条以上的多肽链所组成，需要构成四级结构才能表现出生物活性。蛋白质四级结构是在三级结构基础之上形成的，在四级结构中每个独立的三级结构的肽链成为亚单位，多肽链亚单位之间通过氢键等非共价键的相互作用，即形成了更为复杂的空间结构。这样，只有亚单位集结在一起的四级结构才显示出蛋白质的生物学活性，机体中的大部分酶类在发挥作用时即表现为四级结构。图2-17 总结了蛋白质的高级结构特点，图 2-18 为血红蛋白四级结构的模式图。

蛋白质折叠成稳定的三维结构即构象的过程已在实验室中得到较深入的研究。某些溶剂，如尿素可以破坏折叠蛋白中的非共价键，使蛋白质去折叠成失去自然构象的松散肽链，这个过程称为蛋白质的变性。这种变性是可逆的，当去掉尿素、并加入适量的还原剂



●图 2-17　蛋白质分子高级结构示意图

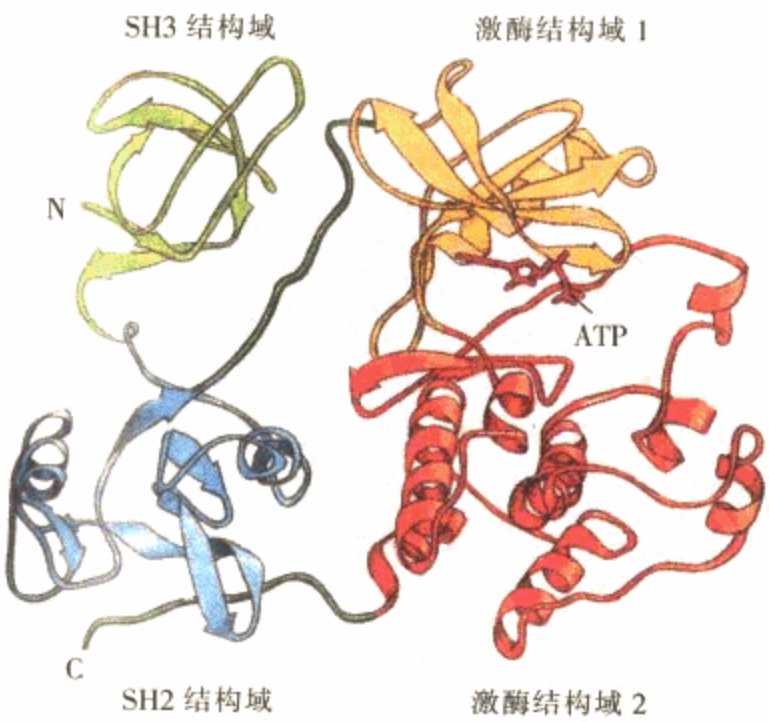


●图 2-18　血红蛋白的四级结构

如 β-巯基乙醇时，变性的蛋白质重新折叠并恢复为原来的构象，该过程谓之复性。目前蛋白质的这种折叠与去折叠的可塑性已被广泛用于基因工程过程中表达蛋白的提取与提取后的复性。

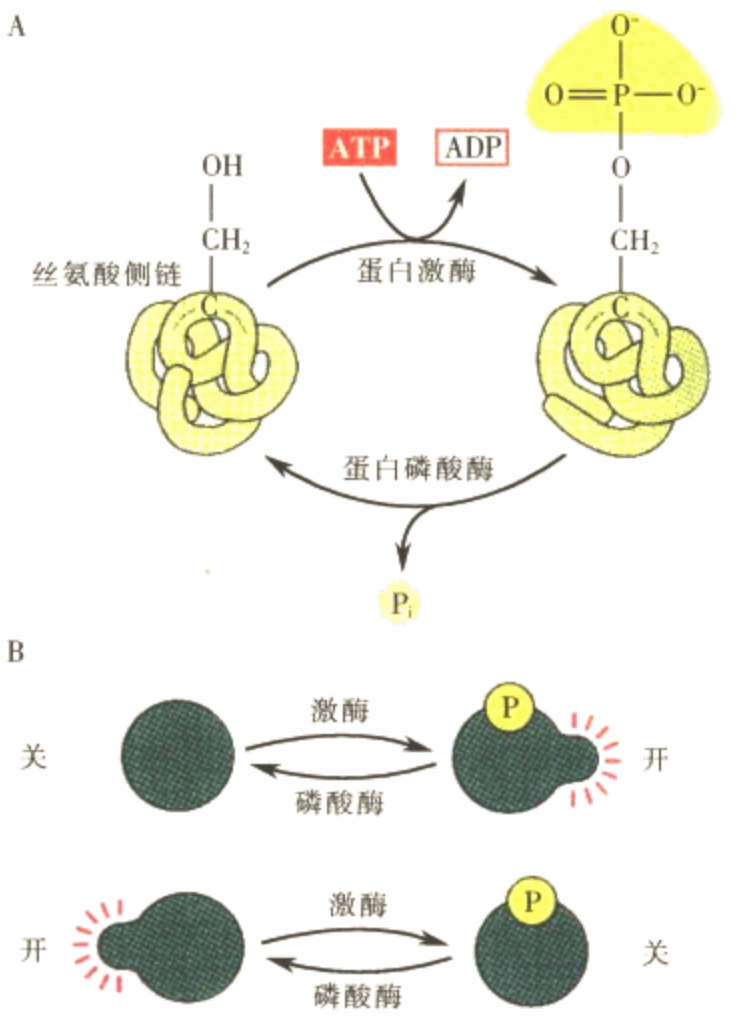
3. 蛋白质的结构与功能的关系　蛋白质的功能取决于其结构（或构象），可以说有什么样的结构就有什么样的功能。一级结构是蛋白质功能的基础，如果氨基酸的排列顺序发生变化，将会形成异常的蛋白质分子。例如，在人体的血红蛋白中，其 β 链上的第六位谷氨酸如果被缬氨酸替代，则形成异常血红蛋白，导致人体镰刀形红细胞贫血。一些常见蛋白如 TGF-β（肿瘤转化生长因子）仅在聚合成蛋白二聚体（dimer）时，才能发挥功能。在活细胞内，蛋白质亚单位也只有组装成大的适当的超分子结构，如蛋白质复合物、酶复合物、核糖体、病毒颗粒等，才能更好地完成生命活动过程。

人们通常根据多肽链的独立折叠单位，即结构域（structural domains）去推断某些蛋白质的功能。组成一个结构域的氨基酸残基通常在 40~350 之间，最小的蛋白仅含有一个结构域，较大的蛋白则含有多个结构域，此时结构域是大分子蛋白质的结构组成单元。一个蛋白质的不同结构域常常与不同的功能相关，例如脊椎动物中具有信号转导功能的 Src 蛋白激酶含有四个结构域：起调节作用的 SH2 和 SH3 结构域，以及其他两个具有酶催化活性的结构域（图 2-19）。一般地，具有相同结构域的蛋白，往往有类似功能，例如，具有螺旋-环-螺旋（helix-loop-helix，HLH）和亮氨酸拉链（leucine zipper，L-Zip）结构特点的蛋白质多为能与 DNA 结合的转录因子（transcription factor）。



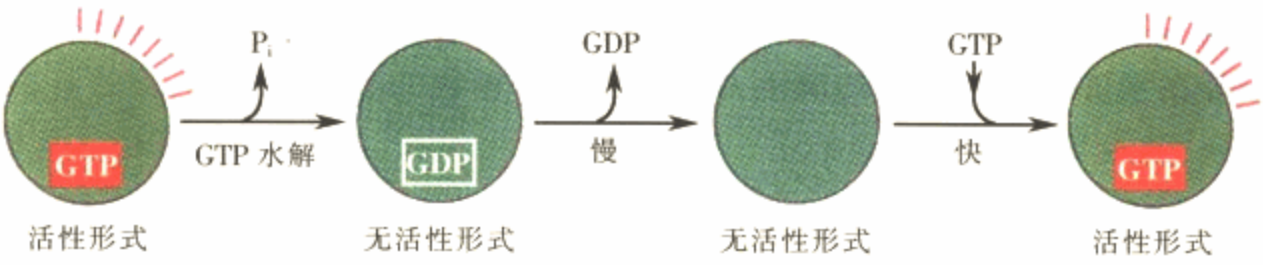
●图 2-19　Src 蛋白的结构域

活细胞内蛋白质功能的发挥与其构象的不断改变密切相关。常见的例子是蛋白质的磷酸化与去磷酸化所引起蛋白质构象的改变，即将一个磷酸基团共价连接至一个氨基酸侧链上能够引起蛋白质较重要的构象改变，同样去除磷酸基团，将使蛋白质恢复原始构象并恢复原始活性。蛋白质磷酸化包括通过酶催化把 ATP 末端磷酸基团转移到蛋白质的丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸侧链的羟基基团上，该反应由蛋白激酶催化，而其逆反应的去磷酸化则由蛋白质磷酸酶完成（图 2-20）。细胞内包含数百种不同的蛋白激酶，每一种蛋白激酶负责不同蛋白质或不同系列蛋白质的磷酸化；同时细胞内还有许多高度特异性的磷酸酶，它们负责从一个或几个蛋白质中去除磷酸基团。对许多种蛋白质而言，磷酸基团总是不断重复地被加到一特定的侧链上，然后被移去，从而使蛋白质的构象不断改变，这是真核细胞完成信息传递过程的重要分子基础。



● 图 2-20　蛋白质的磷酸化与去磷酸化左右其功能的发挥
A. 蛋白质磷酸化与去磷酸化反应　B. 蛋白激酶催化蛋白质磷酸化，可以提高也可以降低蛋白质活性，这取决于磷酸化的位置和蛋白质的结构

此外，磷酸基团的丢失还可驱动一类胞内重要蛋白——GTP 结合蛋白构象的巨大变化。这类蛋白的活化受控于其与三磷酸鸟苷（GTP）或二磷酸鸟苷（GDP）的结合：当蛋白质与 GTP 结合时呈现活性构象，而其与 GDP 结合时则变成一种非活性构象。如同蛋白质的磷酸化作用，该过程也是可逆的（图 2-21）。



● 图 2-21　GTP 结合蛋白形成分子开关

这些 GTP 结合蛋白的活化与去活化起分子开关的作用，在真核细胞生命活动的信息传递过程中起重要作用。

4. 一类特殊类型的蛋白质——酶　酶（enzyme）是由生物体细胞产生的具有催化剂作用的蛋白质。机体内的许多代谢反应乃至信息传递过程均是在酶催化下完成的。酶具有很高的催化效率，比一般催化剂高 10^6~10^{10} 倍，和一般催化剂一样，酶只能加快反应速度，其本身在反应前后没有结构和性质上的改变。酶具有高度的专一性，即一种酶只能催化一种或一类反应。由于大部分酶具有蛋白质四级结构特点，因此，酶具有高度不稳定性，很容易受机体内各种因素影响。酶催化的特异性和高效性是由酶分子中某些氨基酸残基的侧链基团所决定的，这些氨基酸残基在酶蛋白的多肽链中处于不同部位，但通过多肽链折叠可使这些氨基酸残基彼此接近形成特定的区域，以识别和催化底物，这就是所谓酶的活性中心。有些酶除了具有活性中心之外，还有一个可结合变构剂的变构位点，这类酶称为变构酶。一些物质通过与变构位点结合，影响酶蛋白构象，从而达到对酶活性的调

节作用。

（三）多糖存在于细胞膜表面和细胞间质中

糖在细胞中占有很大比例，细胞中的糖除了以单糖的形式存在之外，还广泛分布着多糖和寡糖。线形大分子和分支的大分子糖类可以由简单而重复的单元组成，短链称为寡糖，长链称为多糖。例如，糖原是一种多糖，它完全由葡萄糖连接在一起形成。但细胞中大部分的寡糖和多糖的序列是非重复的，由许多不同的单糖分子组成，这类复杂的寡糖或多糖通常与蛋白质或脂质连接在一起，形成细胞表面的一部分，例如，正是这些寡糖确定了一个特定的血型。因此，细胞中寡糖或多糖存在的主要形式有糖蛋白、蛋白聚糖、糖脂和脂多糖等，这些复合产物也称为复合糖。

糖蛋白（glycoprotein）是共价结合糖的蛋白质，其中的糖链和肽链的连接是有规律的，常见的连接方式是N—糖肽键和O—糖肽键（carbohydrate-peptide linkage）。N—糖肽键是指糖碳原子上的羟基与组成肽链的天冬酰胺残基上的酰胺基之间脱水而形成的糖苷键；O—糖肽键则是糖碳原子上的羟基与组成肽链的氨基酸残基上的羟基脱水而形成的，具有这种性质的氨基酸有丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、羟赖氨酸和羟脯氨酸等。

糖脂（glycolipid）是含有糖类的脂质。根据组成不同，可把糖脂分为4类，即鞘糖脂、甘油糖脂、磷酸多萜醇衍生糖脂和类固醇衍生糖脂。哺乳动物细胞中主要存在的是鞘糖脂，在鞘糖脂中含中性糖类的称为中性鞘糖脂，有些除了含有中性糖类之外，还含有唾液酸或硫酸化的单糖，其中含唾液酸的鞘糖脂又称为神经节苷脂（ganglioside），含硫酸化单糖的鞘糖脂则称为硫苷脂（sulfatide）。

近年来在不同种类细胞的质膜上还发现了一类新的复合糖类，即糖基磷脂酰肌醇（glycosylphosphatidylinositol，GPI），一些蛋白可与GPI的寡糖链结合从而锚定在质膜上。

糖蛋白、蛋白聚糖、糖脂和脂多糖等复合糖主要存在于细胞膜表面和细胞间质中。复合糖中糖链结构的复杂性提供了大量的信息，糖链在构成细胞抗原、细胞识别、细胞黏附及信息传递中起重要作用。如人类ABO血型抗原、免疫球蛋白IgG、黏附分子整联蛋白（integrin）等在发挥作用过程中均离不开其组成部分糖链的参与。

小结

细胞是生物体的结构和功能的基本单位。除病毒之外，一切有机体均由细胞构成。生物体的一切生理活动、生命基本特征以及生命现象都是以细胞为单位体现的。

细胞是生物进化的产物，细胞的形成经历了在原始地球条件下从无机小分子物质产生有机小分子物质；有机小分子物质自发聚合成具有自我复制能力的生物大分子；生物大分子逐渐演变为由膜包围的原始细胞；再由原始细胞演化成今天的原核细胞和真核细胞。生物体的进化又是一个漫长而复杂的演化过程，从原核细胞到真核细胞，从单细胞生物到多细胞生物。原核细胞与真核细胞在结构和功能上有许多相同之处，但原核细胞结构简单，主要结构特点是缺少由膜包围的核以及内膜系统和细胞骨架。真核细胞高度进化，出现了细胞核和由膜包绕的各种细胞器。在细胞的进化史上还有一类细胞，它们在形态结构与遗传结构装置上和原核细胞相似，但有些分子进化特征更接近真核细胞，这类细胞称之为古核细胞。

细胞内的化学成分在自然界中均能找到，主要可以分为生物小分子和生物大分子两大类。生物小分子是指无机化合物（水、无机盐等）和有机化合物（碳化合物、糖、脂肪酸、氨基酸和核苷酸）；生物大分子主要指由生物小分子组成的核酸、蛋白质和酶等。

核酸是生物的遗传物质，分为 DNA 和 RNA。DNA 分子是由两条方向相反的多聚脱氧核苷酸链形成的双螺旋结构，携带着控制生命活动的全部遗传信息；RNA 分子由一条多聚核苷酸链组成，其种类较多，与遗传信息的表达有关；蛋白质是由氨基酸通过肽键依次缩合而成的多聚体，蛋白质是遗传信息的表现形式，是细胞内重要的生物活性物质，其功能涉及细胞的一切生命活动，没有蛋白质就没有生命；酶是具有高度催化活性的蛋白质，然而近年研究发现 RNA 分子也具有 RNA 剪切和催化功能，这样的 RNA 分子称为核酶。

（李　刚）

第三章　细胞生物学的研究方法

细胞，特别是哺乳类动物的细胞，体积微小而结构复杂，因而对细胞、细胞内部的结构、细胞成分的功能及其相互关系的了解程度主要取决于所使用的研究手段和方法。细胞生物学的发展，在很大程度上依赖于研究技术的进步与仪器设备的改进。一种新技术或新方法的创立与应用，常常会给学科开辟一个新的领域，或带来革命性的变化。细胞生物学的研究方法很多，原理和操作步骤各不相同。本章将从细胞的形态观察、细胞的分离和培养、细胞组分的分离纯化和测定、细胞化学和细胞内分子示踪，以及功能基因组学研究技术等方面，对一些常用技术的原理、方法和应用作简要介绍，以期同学们能对细胞生物学研究方法有个概貌的了解，为今后从事生命科学的研究打下基础。

第一节　显微镜技术

人眼的生理结构限定了其分辨能力约为 100μm。典型的动物细胞直径为 10~20μm，比人眼所能看到的颗粒小 5~10 倍。因此，尽管 A. Van Leeuwenhoek 在 17 世纪 70 年代用他自制的显微镜看到了细菌和动物的精子细胞，但直到 19 世纪初制造出具有更高分辨能力的光学显微镜时，才确认所有的动物和植物都是由细胞构成的，即细胞学说（Cell doctrine）。

20 世纪 30 年代末、40 年代初，电子显微镜开始应用于生物学的研究，发展了一系列标本制备技术并不断开发出新的切片方法和染色技术，使细胞内部微细结构的研究不断进步。

一、光学显微镜技术

光学显微镜与细胞生物学同步而生，至今仍然是一个必不可少的研究工具。近年来，对细胞各种成分的特殊标记与影像学观察以及计算机重建三维结构等技术的应用使得光学显微镜的作用显得尤为重要。

（一）普通光学显微镜的分辨极限是 0.2μm

光学显微镜（light microscope）主要由聚光镜、物镜和目镜三部分组成。影响显微镜成像清晰度最关键的因素，是显微镜的分辨率（resolution）。分辨率是指能够区分相近两点的最小距离。能够区分的两点距离越小，表示显微镜的分辨率越高。显微镜的分辨率是由物镜决定的，它和物镜的镜口率、照明光线的波长有直接关系。分辨率（R）可按下式计算：

$$R=0.61\lambda/n\cdot\sin\theta$$

$n\cdot\sin\theta$ 为镜口率，亦称数值孔径（numerical aperture）；n 为聚光镜和物镜之间介质的折射率（空气为 1，油为 1.5）；θ 为标本对物镜镜口张角的半角（$\sin\theta$ 的最大值为 1）；λ 为照明光源的波长（白光为 0.5μm）。

带入公式则：$R=0.61\times0.5\mu m/1.5\backsimeq0.2\mu m$

用可见光做光源的光学显微镜，分辨率是 0.2μm。

一般来说，光不能用来检测比它本身波长短得多的结构细节，这是所有显微镜的一个

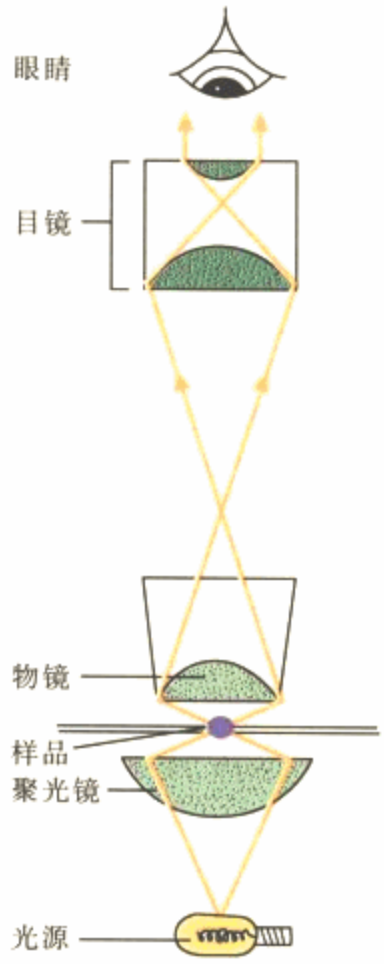
基本限度。可见光的波长在 0.4~0.7μm 之间，一般的细菌和线粒体大小 0.5μm 左右，光学显微镜下能够清晰可见。通常将光镜下所见物体结构称作显微结构（microscopic structure）。

普通光学显微镜的放大系统一般由物镜和目镜组成。物镜靠近被检物体，进行第一次放大，目镜靠近眼睛，将物镜放大后的图像再放大（图 3-1）。物体经过两次放大后，总放大倍数为两次放大倍数的乘积。放大倍数越大并不意味着越能够看清楚更小的物体，光学显微镜的放大倍数有一个极限，可用下面的公式表示：

$$\text{最大放大倍数}=\frac{\text{人眼分辨率}(\sim 100\mu m)}{\text{光镜分辨率}(\sim 0.2\mu m)}=\sim 500$$

超过以上的放大倍数属于无效放大。

多数细胞总重量的 70%是无色透明的水，只有很少的内含物不透光。因此未经处理的细胞在普通光镜下几乎是看不见的。使细胞成为可见的常用方法就是用染料对细胞的不同组分进行染色（staining）。一些纺织用染料被发现可用于生物组织的着色，并对细胞的特殊部位具有选择性，如苏木精（hematoxylin）对负电荷分子有亲和性，能显示出细胞内核酸的分布；酸性染料如伊红（eosin）可使细胞质染色；苏丹染料（sudan dye）在脂肪中的溶解度比在乙醇中大，所以苏丹染料的乙醇饱和溶液能使脂肪着色。尽管已发现了许多特异性染料，但其大部分的作用机制尚不清楚。



●图 3-1　光学显微镜

图中显示的是普通光学显微镜的光路。光线被聚光镜聚集于样品，物镜和目镜的组合能聚焦形成眼睛中的样品图像

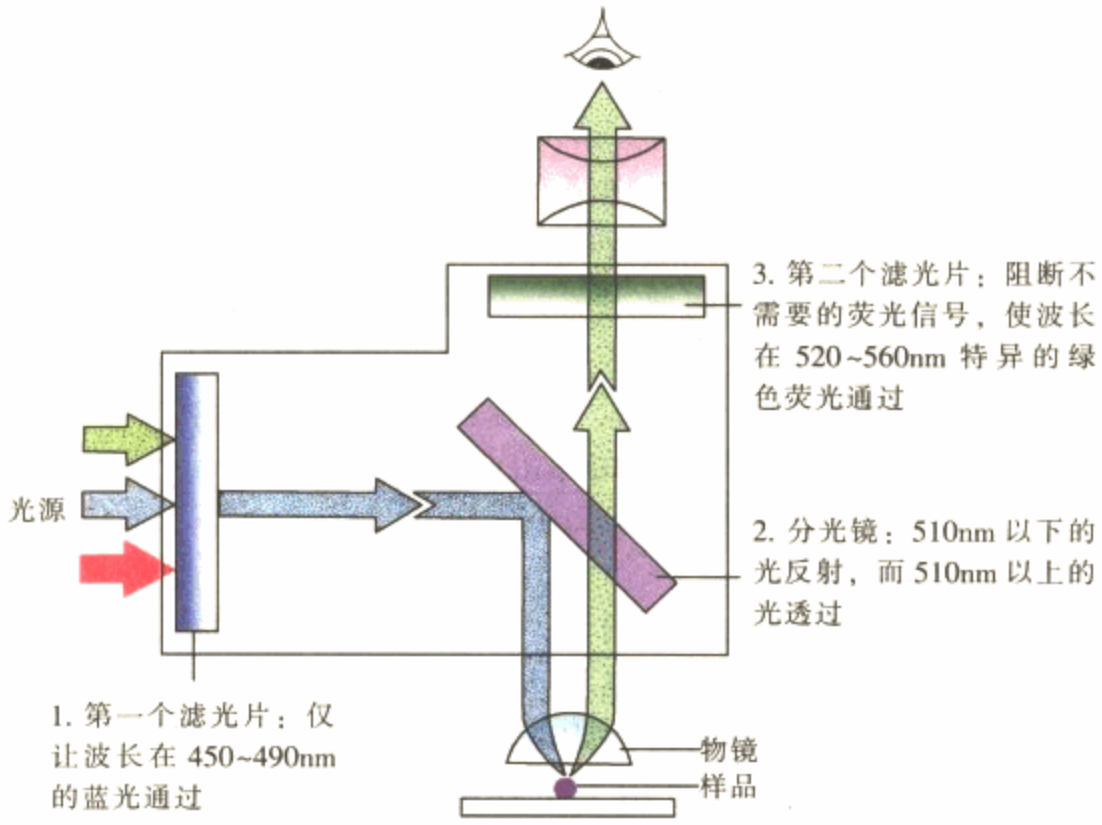
生物组织在染色前必须固定（fixation），固定使得大分子交联而保持在原有的位置上，不至于在以后的染色等处理过程中移位或丢失而产生人工假象。常用的固定方法是将组织放在固定液中，如甲醛或戊二醛溶液，这两种固定液都能够与蛋白质的游离氨基酸形成共价键，从而将邻近的蛋白质分子牢固地交联在一起。

大部分的组织太厚而无法在显微镜下直接观察，固定后还需制成薄切片（section），然后将切片黏附在载玻片表面进行染色。但由于固定后组织仍很柔软，在切片前需用支持剂——蜡或树脂进行包埋（embed）。适用于光镜观察的切片厚度为 1~10μm。

（二）荧光显微镜可以呈现强反差的彩色图像

荧光分子可以在吸收特定波长的光后，发射出更长波长的可见光，前者称为激发光（excitation light），后者称为发射光（emission light）。由于荧光分子可以使被检样品呈现不同的染色，因此也称荧光染料。细胞内某些天然物质如叶绿素就是荧光分子；一些细胞成分虽然不是荧光分子，但可以用荧光分子对其进行染色或标记，这在实际当中有着广泛的应用。比如，吖啶橙能对细胞 DNA 与 RNA 同时染色，显示不同颜色的荧光。DNA 呈绿色，RNA 呈红色。与抗体共价结合的荧光分子，可以用来特异性地检测细胞表面或固定后的细胞内特定的抗原。

与普通光学显微镜相比，荧光显微镜（fluorescence microscope）在结构上的突出特点是具有两组滤光片。第一组滤光片在光源与标本之间，仅能通过荧光染料的激发光；第二组滤光片在标本与物镜之间，仅能通过激发出的荧光（图 3-2）。荧光显微镜观察到的像是以暗背景为映衬的，因此具有成像反差强，检测灵敏度高的特点。此外，使用荧光显微镜观察细胞内标记了不同荧光染料的分子可以呈现彩色图像。多种对细胞内特定离子有特异亲和性或依赖于细胞内酶的催化作用才能发出荧光的活体荧光染料，使人们可以对活细胞



●图 3-2　荧光显微镜的光学系统

荧光显微镜的滤镜组包括两个滤光镜（1 和 3）和一个分光镜（2）。检测荧光分子荧光素的一套滤镜组如图所示。由于放大，荧光图像的亮度与物镜的镜头孔径成比例，因此，对于这种显微镜来说，高镜头孔径的物镜特别重要

内分子的动态变化进行实时观察。基于以上特点，荧光显微技术被广泛应用于细胞生物学研究。

（三）相差显微镜通常被用于观察活细胞

在观察样品的制作过程中，细胞成分的丢失或失真通常是难以避免的。若想避开这个问题，只有不加固定、染色等程序，直接观察活细胞，这需要特殊的光学系统。

光的波长决定可见光的各种色彩，振幅决定光的亮度。波长和振幅的改变能够被人眼所辨识。光在通过活细胞时，波长和振幅几乎没有改变，但由于细胞各结构的密度不同，通过致密部分（如细胞核）的光线，速度变慢，与通过邻近部位（如细胞质）的光线之间产生相位偏差或光程差，这种差异人眼不能分辨。相差显微镜（phase contrast microscope）利用光的衍射和干涉效应把透过标本不同区域的光波的光程差变成振幅差，使活细胞内各种结构之间呈现清晰可见的明暗对比。

观察培养细胞的结构常用倒置相差显微镜，它的特点是光源和聚光镜装在载物台的上方，相差物镜在载物台的下方，可以清楚地观察到培养瓶内的贴壁或悬浮细胞。

（四）暗视野显微镜通过散射光成像

暗视野显微镜（dark-field microscope）是将光源以一定的角度倾斜照射到样品上，照射光无法进入物镜，只有从被照样品发出的散射光能进入物镜被放大，在黑暗的背景下呈现明亮的像。暗视野显微镜主要是观察物体的轮廓，分辨不清内部的微细构造，适合于观察活细胞内的细胞核、线粒体、液体介质中的细菌和真菌等。

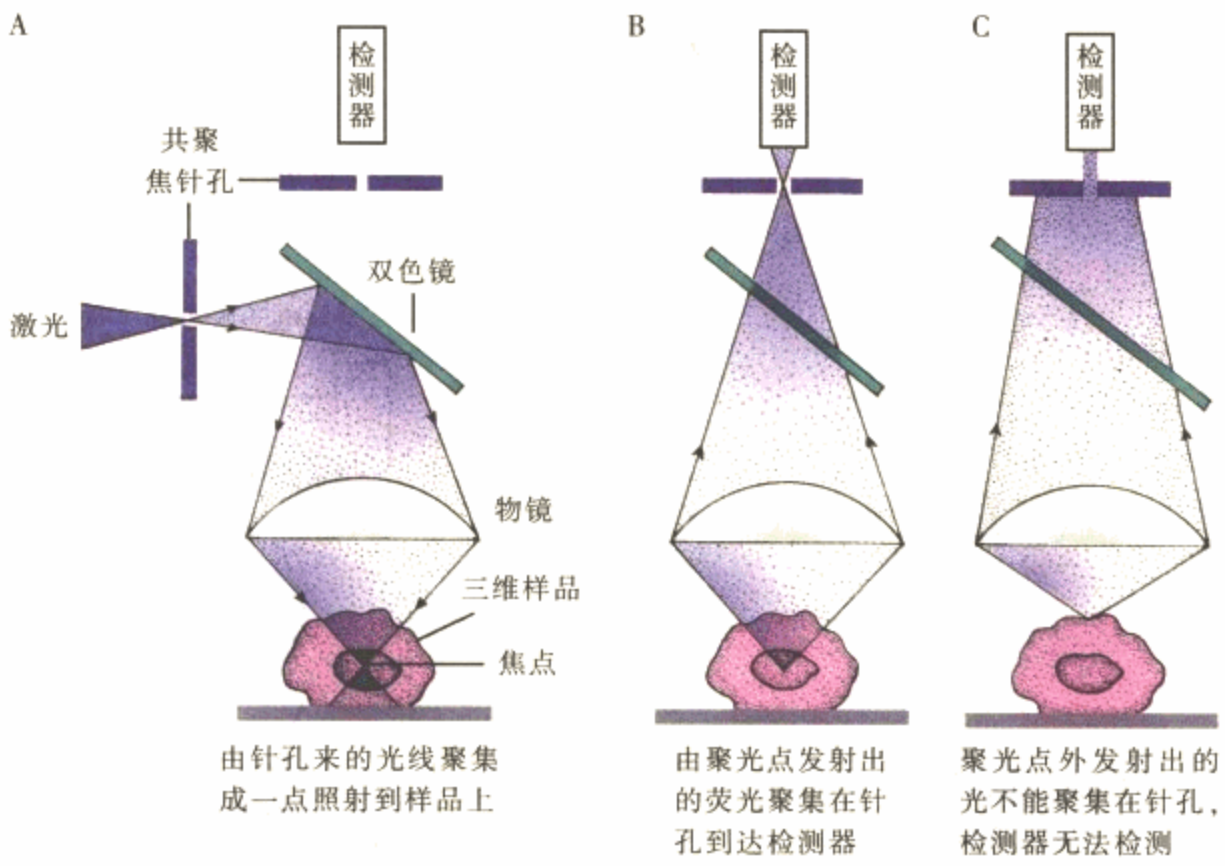
（五）显微电影摄影技术能记录细胞或细胞器的运动过程

相差显微镜和暗视野显微镜的最大优点是能够观察活细胞的活动，但由于许多细胞运动缓慢，难以在短时间内完成观察，因此需要用显微电影摄影术（microcinematography）或电视录像（video recording）以一定时间间隔拍摄记录。当影片或电视录像带以正常速度放映时，所拍摄的情节就被大大地加快了，用这种方法可以准确地记录细胞或细胞器的运

动过程和速度。

（六）共聚焦激光扫描显微镜可以提供高清晰的彩色三维图像

用普通光学显微镜观察标本的薄切片，无法得到三维结构的信息，且光学显微镜是全视野照明，来自焦平面前后的漫射光线参与最后成像，降低了图像的反差和分辨率。共聚焦是指物镜和聚光镜互相共焦点，亦即两者同时聚焦到一个点，保证了只有从标本焦面发出的光线聚焦成像，焦面以外的漫射光不参加成像，大大提高了分辨率，使图像更加清晰。共聚焦激光扫描显微镜（confocal laser scanning microscope）以单色激光作为光源，对样品焦平面进行扫描，产生二维图像，改变焦平面即可得到一系列二维图像（图 3-3）。图像信息经计算机处理，就可得到完整的三维图像，并可从空间的任意角度观察标本的整体结构。



●图 3-3　共聚焦激光扫描显微镜

A. 激光经针孔聚于样品的一点上　B. 从样品点上发出的荧光聚焦于第二个共聚焦针孔上　C. 从样品的其他部位发出的光不能聚焦于第二个针孔处，故不能成像。通过光束扫描样本，在焦平面上建立一个清晰的二维图像，而不受样品其他区域光线的影响

共聚焦激光扫描显微镜多用于检测发射荧光或用荧光标记的物质，在细胞生物学的研究中被广泛应用。共聚焦激光扫描显微镜可以辨别细胞内许多复杂物质的三维结构，包括构成细胞骨架系统的纤维，染色体及基因的排列等。

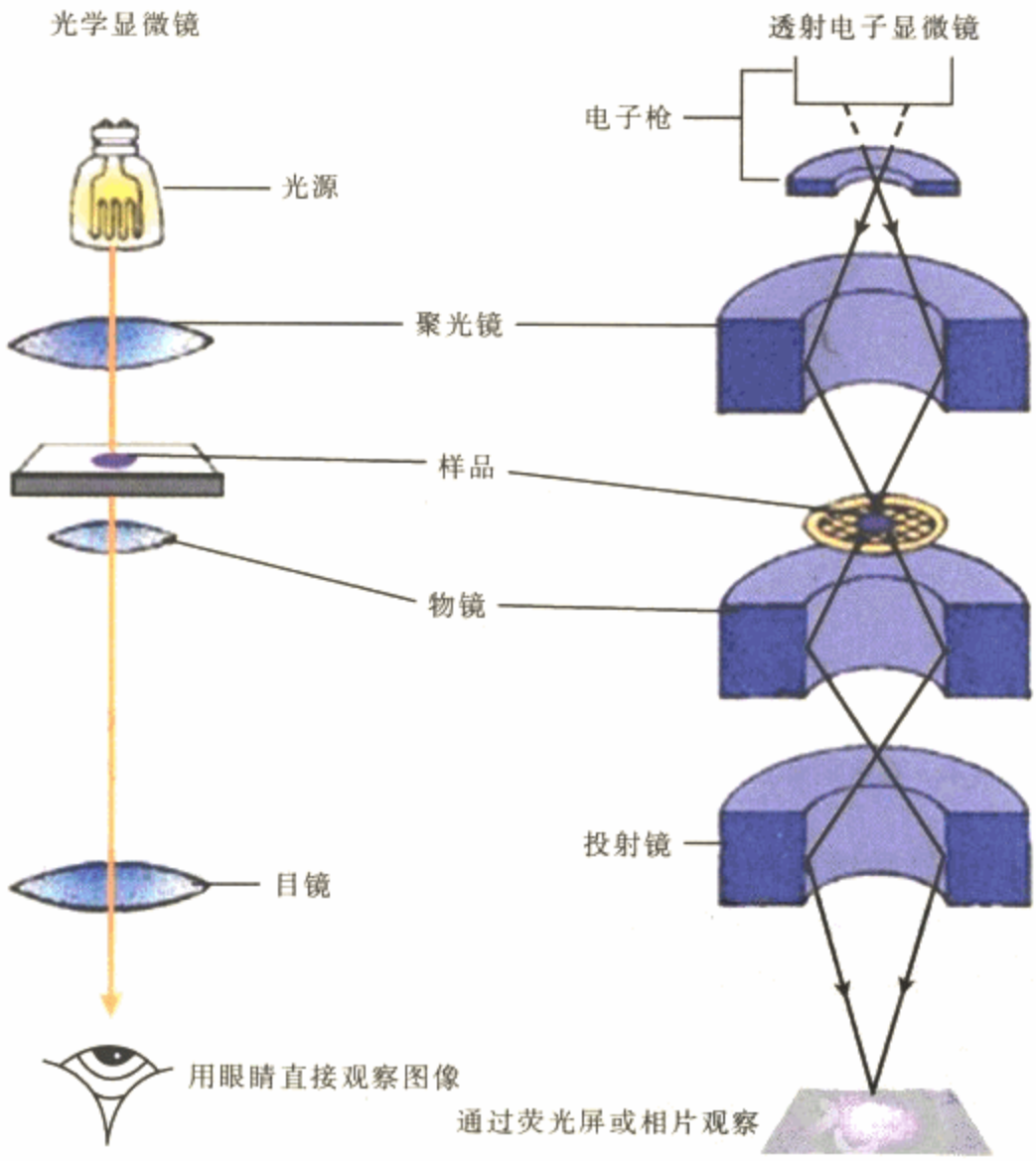
二、电子显微镜技术

光学显微镜的分辨率受照明光源波长的限制，无法分辨小于 0.2μm 的微细结构。电子的波长比光要短得多，电子显微镜（electron microscope，EM）用电子束做光源大大提高了显微镜的分辨率。电子运动越快，波长就越短，以 10 万伏特电压加速的电子，其波长约为 0.004nm。理论上，用这样短波电子照明，显微镜的分辨率可达到 0.002nm，但由于电磁透镜的相差比玻璃透镜的相差要大得多，电镜的实际分辨率不超过 0.1nm。这样的分辨率用于检查金属材料时，可以清晰看到相邻的金原子间的距离（0.2nm）。生物样品由于

标本的制备，反差及照射损伤等原因，电子显微镜的分辨率实际上仅约 2nm，尽管如此，它仍是光学显微镜分辨率的 100 倍，可以观察到细胞膜、细胞核、线粒体、高尔基体、核糖体、中心粒等细胞器的微细结构。这种在电子显微镜下观察到的细胞的结构称为亚显微结构（submicroscopic structure）或超微结构（ultrastructure）。

（一）透射电子显微镜用于观察细胞的超微结构

电子显微镜通常是指透射电子显微镜（transmission electron microscope，TEM），它的总体设计与光学显微镜相似，但要大得多，且上下颠倒。照明光源是释放电子的钨丝，作为阴极位于约 2m 高的镜筒顶端。电子能与空气中的分子碰撞而发生散射，故需将镜筒中的空气抽出保持高度真空状态。由灯丝发射的电子受到其下方阳极吸引而加速，通过一个中央小孔而形成电子束，沿镜筒向下运动。沿镜筒设置的精密线圈产生轴对称磁场从而作为电磁透镜使电子聚焦，就如同光学显微镜中光线被玻璃透镜聚焦那样（图 3-4）。标本通过一个气闸送入镜筒，置于电子束的通道上。电子束通过标本时，根据标本各部位密度的不同，部分电子发生散射，只有剩余的电子成像，经物镜和投影镜等放大后投射到照相底片上或荧光屏上。散射的电子不参加成像，故标本中密度大的部分成像后形成电子流量减少的暗区，相反，标本密度小的部位散射电子少而形成明区。



●图 3-4　光学显微镜和透射电子显微镜的比较

用于电镜观察的生物标本需特殊制备。电镜标本必须置于高真空中进行观察，所以含水的活组织、细胞是无法观察的。为防止生物样品在死亡后和在脱水过程中产生结构改变，离体的生物标本要迅速加以固定。常用戊二醛和四氧化锇双重固定，戊二醛在蛋白质分子之间形成共价键将它们交联固定，四氧化锇除了与蛋白质共价结合之外，还对多种成

分特别是对脂类有良好的固定效果。

电子的穿透力很弱，镜检前必须将固定后的组织制成 50~100nm，即约细胞的 1/200 厚度的超薄切片。为此，要将固定和脱水的标本放入液态的单体树脂中浸透，加温使之聚合成为固体的包埋块。在特定的超薄切片机上，用玻璃刀、钻石刀将包埋块切成超薄切片，最后将切片置于直径 3mm 的金属载网上进行观察。

电镜下所见到的标本的反差，取决于组成元素的原子序数，原子序数越高，散射的电子越多，反差越大。生物分子主要是由一些低原子序数的轻元素（氢、氧、碳、氮等）组成的，它们散射电子的能力非常弱，在电镜下难以见到明暗反差。为此，常常在切片前后用一些锇、铀、铅等重金属的盐类浸染标本进行电子染色，以增大反差。细胞的不同成分对这些盐类有不同的亲和力，造成染色程度的不同，显示不同的反差。例如，锇对脂质容易着色，用来观察细胞的各种膜性构造效果非常好。

高压透射电镜（high-voltage electron microscope，HVEM）的光源的加速电压一般在 20 万伏特以上。加速电压在 50 万伏特以上则称为超高压电子显微镜。目前世界上已有加速电压在 300 万伏特的超高压电镜。超高压电镜由于增加了加速电压，增强了电子的穿透能力，可以观察更厚的电镜切片。在 10 万伏特下，可见到 3~7μm 厚切片中的细胞超微结构，加速电压为 300 万伏特时，可以观察到 10μm 厚切片内的超微结构。而且加速电压越高，电子波长越短，电镜的分辨率也越高。

（二）扫描电子显微镜常用于观察生物样品表面的立体结构

用透射电镜观察超薄切片仅能反映细胞的二维结构，虽然可以通过观察大量的连续切片重建立体图像，但费时费力，步骤繁琐。用扫描电子显微镜（scanning electron microscope，SEM）可以直接观察标本表面的三维形态。扫描电镜比透射电镜小，结构简单。透射电镜是电子透过标本后成像，扫描电镜是电子束照射在标本后产生二次电子成像。样品需经固定、干燥并用重金属膜覆盖。由光源发出的非常细的电子束（一次电子）在样品表面逐点逐线地扫描，产生的散射，即二次电子信号被收集、转换、放大，在电视荧光屏上同步扫描成像（图 3-5）。样品产生二次电子多的部位在荧光屏上相应的点就亮，反之则暗。由于二次电子产生的多少与电子束在标本表面的投射角有关，亦即与样品的表面起伏有关，在荧光屏上就会得到样品表面形貌的立体图像。

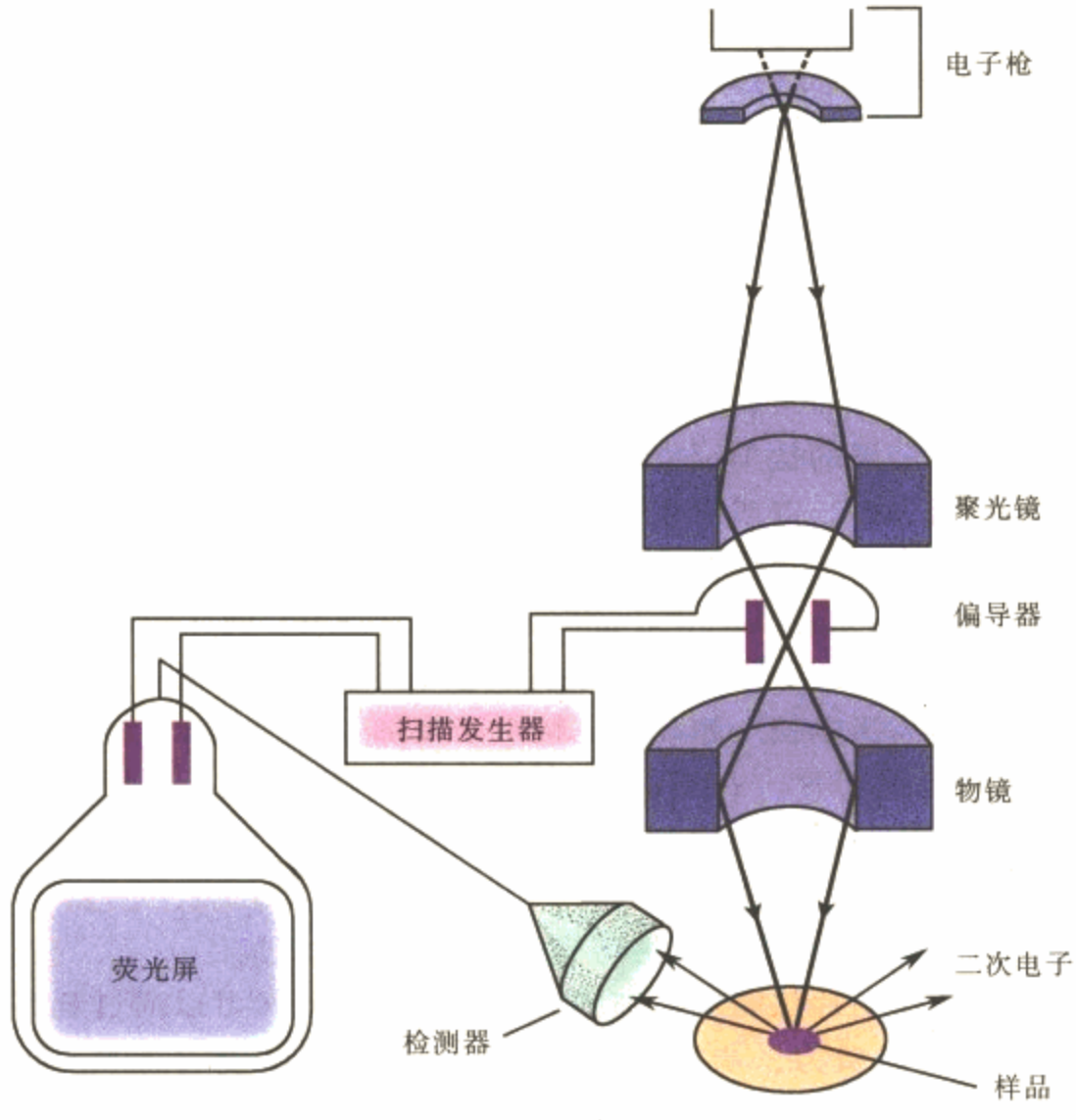
扫描电镜分辨率较低（3~10nm），不及透射电镜，多用于细胞整体或组织的观察。

（三）透射电子显微镜借助金属投影、冰冻断裂及冰冻蚀刻技术可获取三维图像

金属投影法(metal shadowing）把带有干燥样品的载网放在真空罩中，高温蒸发铂或钯等重金属，使金属颗粒以一定的倾斜角度喷向样品。这样，随着样品表面的高低起伏，重金属形成不同厚度的薄膜，显示了投影（shadowing）效果，给出了一个样品表面结构的三维图像。如果喷镀的样品很小或喷镀后的金属膜薄得足以使电子束透过，则可以直接用透射电镜进行观察，比如一些蛋白、核酸类大分子，病毒颗粒及细胞壁这样的样品。对厚样品则需在喷镀后将样品部分溶去，仅剩薄薄的样品的金属复型（replica），再用碳元素垂直喷镀形成一碳膜，加固复型，然后在透射电镜下观察复型。下述冰冻断裂与冰冻蚀刻两种技术是金属复型法的最好应用事例，为细胞生物学的研究作出了重大贡献。

冰冻断裂（freeze-fracture）多用于观察细胞膜性结构的内部构造。将样品用液态氮（-196℃）快速冷冻后，用刀切割冻结的样品组织块。切面常常从膜脂质双层的中央疏水部通过，暴露出膜的内部构造。将暴露出的切面用铂进行喷镀，制成复型后观察。用此技术对蛋白质在膜内的分布情况进行观察，方便、直观，具有划时代意义。

冰冻蚀刻（freeze-etching）与冰冻割断法一样，低温（液态氮，-269℃）下切割后，



●图 3-5　扫描电镜的工作原理

在扫描电镜中，电磁线圈聚焦电子束扫描样品，产生二次电子，经检测器收集后在荧光屏成像

徐徐升温，真空下使水分升华（冷冻干燥），在细胞周围的冰迅速减少下陷的同时，细胞内的游离水也减少下陷，膜和其他一些结构暴露出来，制作复型后有显著的断面浮雕效果，用于观察细胞的内部构造。

三、纳米显微技术

从 1665 年 Robert Hooke 第一次使用显微镜观察细胞以来，显微镜的发展经历了光学显微镜时代和电子显微镜时代，现在已进入了扫描探针显微镜（scanning probe microscope，SPM）时代。扫描探针显微镜不仅实现了人们直接观察单个原子的梦想，而且还能对原子进行操控、组合，形成具有新的物理、化学、生物学特性的颗粒。扫描隧道显微镜和原子力显微镜是扫描探针显微镜体系的主体，由于它们的分辨率和可操控的颗粒在纳米水平，因此也称作纳米显微技术。

（一）扫描隧道显微镜可直接观察到大分子的三维结构

扫描隧道显微镜（scanning tunneling microscope，STM）是利用量子力学的隧道贯穿理论设计制造的，它使用一个直径为原子尺度的精密的探针在观察标本的表面进行扫描，探针尖不接触所研究样品的表面，与样品之间保持大约 1nm 的微小的间隙，在针尖和样品间施加一定电压，就会产生所谓的隧道效应，即在两者之间出现以一个根据观测表面形貌变化的隧道电流。当探针在平行于样品表面的恒定高度移动并扫描时（恒高方式），同步记录隧道电流的变化，就可以获得所观察物体表面的原子水平的微观信息。也可以通过反

馈系统的调节，使探针尖随样品表面的变化上下移动扫描并保持恒定的隧道电流，此时记录针尖和样品表面的距离变化就可以得到表面的形貌特征（恒流方式）。

扫描隧道电镜的主要优点是有非常高的分辨率（侧分辨率为 0.1~0.2nm，纵分辨率 0.001nm），而且可以在大气和液体等非真空状态下工作，避免了其他电镜采用的高能电子束对样品的辐射和热损伤作用，因此在细胞生物学、分子生物学和日益发展的纳米生物学的研究中得到非常广泛地应用。迄今已经直接用扫描隧道显微镜观察到自然状态下 DNA 分子双螺旋结构中的大沟和小沟以及大肠杆菌的环状 DNA 的结构。

（二）原子力显微镜可对单个分子进行操控

原子力显微镜（atomic force microscope，AFM）是在扫描隧道显微镜基础之上发展起来的新型扫描探针显微镜，与扫描隧道显微镜相比，原子力显微镜的一个突出的优点是不需要所检测的样品具有导电性，它通过分析探针尖与样品之间的原子间作用力来获取所观察表面的微观信息，这对研究通常不导电的生物材料是一项非常有意义的革新。

原子力显微镜的探针被置于一个弹性系数很小的微悬臂的一端，微悬臂的另一端固定。探针尖和被检测的样品表面轻轻的接触，针尖的原子和样品表面的原子之间的微弱的排斥力使对力的变化非常敏感的微悬臂的游离端发生弯曲，经过光学透镜准直和聚焦后投射在微悬臂背面的一束激光及其监测器能将这种微弱的曲度的变化转换为电流的变化。通过移动样品平台使探针在被检测材料的表面逐点作快速扫描时，样品表面的微细结构特征的三维坐标数据就被转换为图像信息并准确地呈现在屏幕上。

原子力显微镜的工作范围与扫描隧道显微镜相似，可以在三态（固态、气态和液态）状况下工作，但其分辨率不及后者，目前主要用于活细胞表面及生物大分子空间伸展及其结晶体表面的观测，例如肌动蛋白聚合动力学中自组织纤维的多态性分析。原子力显微镜可以对单个分子进行操作，通过检测操作后引发的生物化学反应来研究生物大分子和大分子复合物的功能，即进行所谓的分子手术（molecular surgery）。

以扫描隧道显微镜和原子力显微镜为代表的纳米显微技术实现了人们直接观察和操控原子的梦想，也使纳米技术进入到生命科学的研究中。纳米技术与生命科学相结合，产生了 21 世纪最典型的交叉学科——纳米生物学。纳米生物学的发展使人们对生物大分子复合物和细胞生理活动的认识进入到前所未有的领域。

第二节　细胞的分离和培养

几乎所有高等生物（包括动物和人）的组织都是由许多种不同类型细胞组成的，为了解某一种细胞的生命活动过程，常需要大量的同一种细胞，这就要求从组织中分离和纯化目的细胞，并能够在体外进行培养。细胞的分离和培养是细胞生物学的基本研究技术。

一、不同类型细胞的分离

从组织中分离细胞的第一步是将组织制备成游离的细胞悬液，通常是将组织剪成小块，然后用胰蛋白酶、胶原酶去消除细胞间的连接和细胞外基质，用金属离子螯合剂乙二胺四乙酸（EDTA）除去细胞黏着所依赖的钙离子。在操作过程中必须遵守以下几个最基本的原则：①分离体系所用的溶液必须是等渗的，要具有缓冲性的离子强度；②分离体系应保持低温，以降低细胞的代谢活动；③无菌操作，以备进一步用于细胞培养和分离纯化某些成分；④所用的试剂、器皿需要高压灭菌或过滤除菌。细胞分离需根据不同细胞的特征采用不同的方法。

（一）差速离心或密度梯度离心

根据细胞的大小和细胞密度不同，可通过差速离心或密度梯度离心进行分离。差速离心和密度梯度离心的基本要点见本章第三节。

（二）流式细胞技术

流式细胞仪（flow cytometer），也称荧光激活细胞分选仪（fluorescence activated cell sorter，FACS）是从多细胞悬液中分离目的细胞的精密仪器。流式细胞仪一般由液流系统、激发光器件、信号检测和控制系统四部分组成。通常用氩离子激光发出的激光束为激发光，通过调节液压，迫使悬浮细胞排成单列，按重力方向流动，当细胞通过激光束检测区时，细胞被激光束照射而向各个方向发出散射光，若经荧光染色的细胞，就会发出一定强度的荧光。仪器的检测系统可逐个对细胞的散射光和荧光强度进行测定，并将测得的光信号转变成电信号，由电子控制台放大和显示。因此，流式细胞仪具有更广泛的用途。在用于细胞分离上，其特点是用带有荧光的特异抗体标记待分离的细胞，然后在流式细胞仪中从未标记的细胞中分选出标记细胞。当一个有荧光抗体标记的细胞液滴通过激光检测器时，将被带上负电，不含荧光标记的细胞被带上正电，这些带电细胞液滴通过电场时将偏离原来流动的方向，分别收集带正、负电荷的细胞即可得到想要分离的细胞（图 3-6）。流式细胞仪可以每秒 2 万个的速度对细胞进行分选，其纯度可超过 95%。

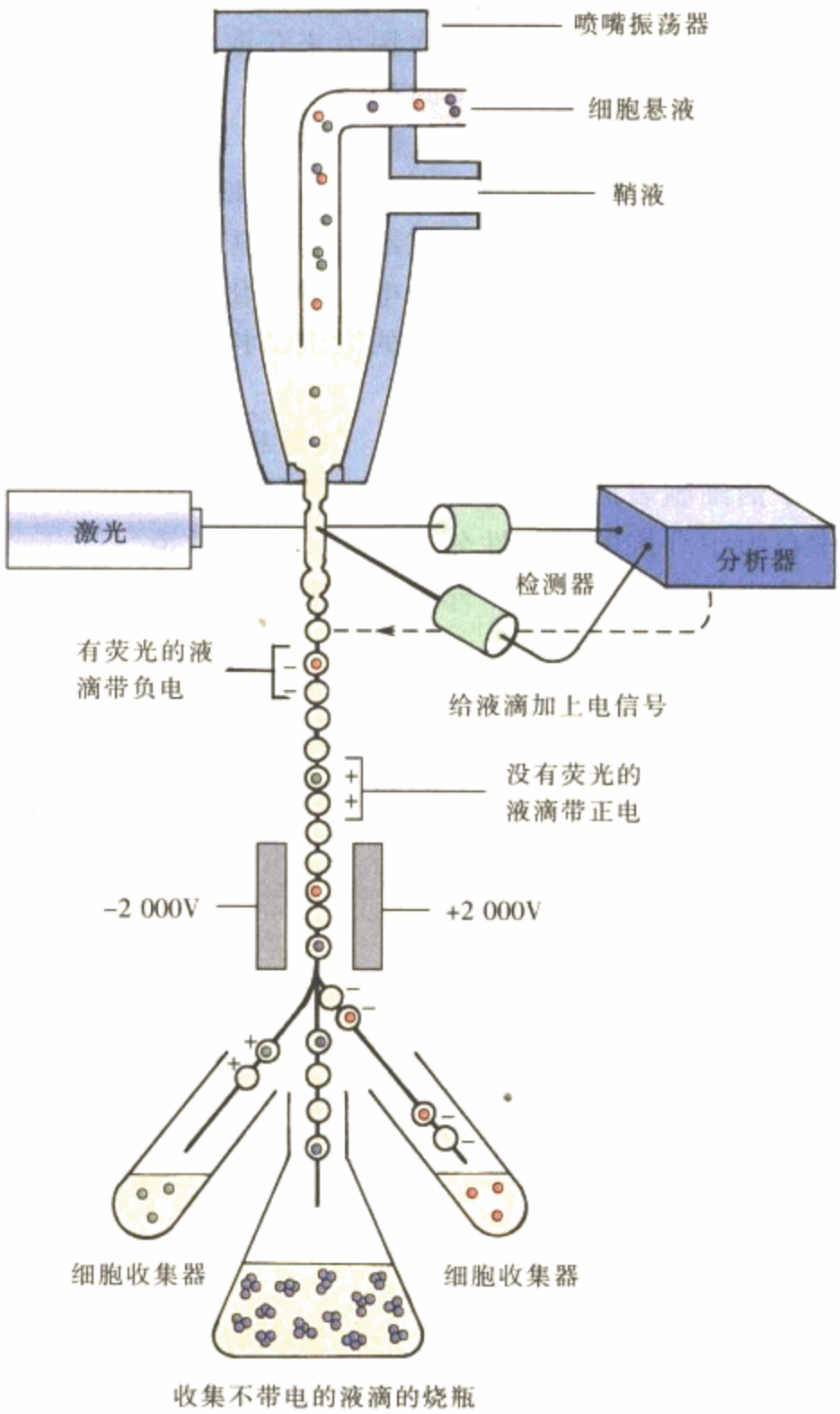


图 3-6　流式细胞仪原理图解

监测通过激光束的细胞的荧光。根据细胞是否带有荧光，含有单个细胞的液滴被带上负电或正电。在电场的作用下将带有不同电荷的液滴分别收集于各自的细胞收集器。注意：要将细胞浓度调整到大多数液滴不含细胞并且能够流入废液缸

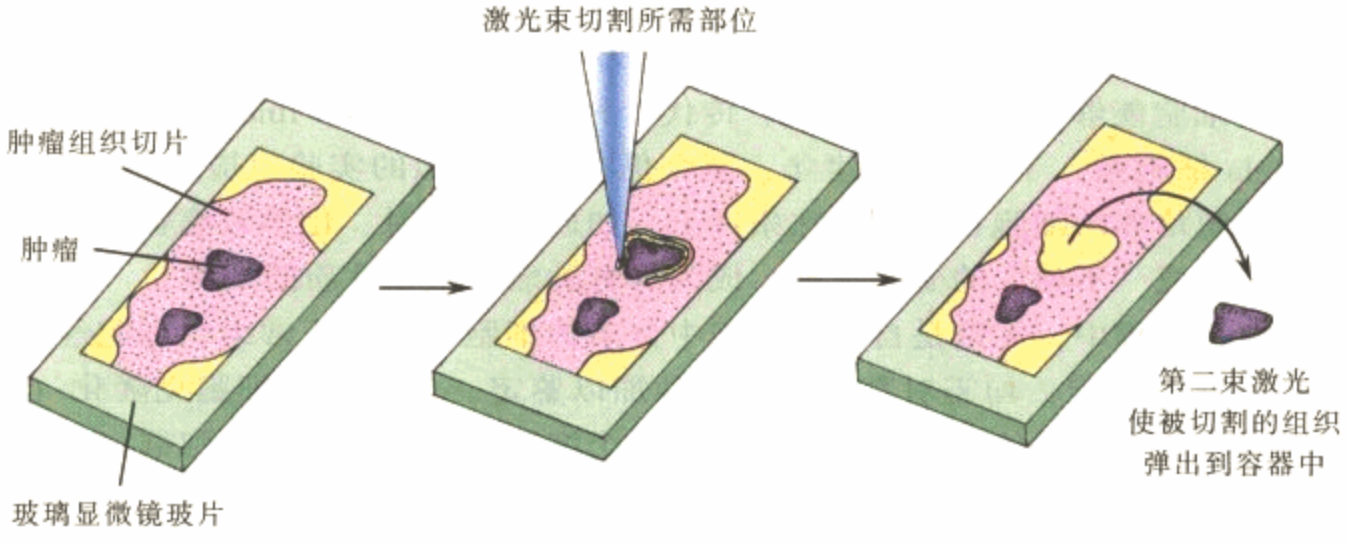
（三）免疫磁珠法

免疫磁珠（immunomagnetic microsphere）是一种人工合成的内含磁性氧化物核心的免疫微球颗粒，其中心是 Fe_2O_3 或 Fe_3O_4 颗粒，外包一层聚苯乙烯或聚氯乙烯等高分子材料。在外部磁场作用下，磁性微球可迅速从介质中分离出来，当外部磁场撤离后，微球又可重悬于介质中。由于微球的外表面为聚乙烯性质的高分子材料，很容易包被不同类型的单克隆抗体。因此利用带有特定单抗的免疫磁珠与靶细胞特异结合的特点，能快速地从多细胞悬液中将目的细胞分离出来。在操作过程中，首先将待分离细胞与包被有特定单抗的免疫磁珠混合孵育，并将分离柱安装于磁场中，然后将磁珠-细胞混合液缓慢过柱，此时在柱外磁场的作用下，与磁珠结合的细胞被磁场吸附，未结合的细胞从柱中流出，进一步洗去未结合的细胞后，去除磁场，回

收目的细胞。免疫磁珠法操作简便，特异性强，具有很好的细胞回收率，同时磁珠颗粒对细胞无影响。连续两次过柱分选可进一步提高分选细胞纯度，通常可达 95%~99%。

（四）激光捕获显微切割技术

近年发展起来的激光捕获显微切割技术（laser capture microdissection，LCM）虽然不能用于分离活细胞，但其突出优点是能够从组织切片中精确地分离一个单一的细胞。其一般过程是：制备组织切片（通常是冰冻切片），在显微镜下将组织切片覆以特制的透明薄膜，用激光束切割所需的细胞区域，覆膜在激光束经过的地方被溶化，并与下面的细胞紧密连在一起，然后再用另一激光束将其弹出到细胞收集管（图 3-7）。分离的细胞可用于生化与基因组分析等研究。激光捕获显微切割技术将形态学观察与分子水平研究有机结合起来，特别适用于待分离细胞在组织（切片）中的数量较少或呈散在分布的情况。目前迅速发展的激光捕获显微切割技术正在与高通量的基因芯片技术结合，将在生物医学领域中得到广泛应用。



●图 3-7　激光显微切割技术

激光显微切割允许从组织切片中选择分离细胞。这种方法使用激光束切割所需部位并将其弹出到容器中，因此即使单个细胞也可以从组织样品中分离

二、细胞培养

细胞培养（cell culture）是指细胞在体外的培养技术，即无菌条件下，从机体中取出组织或细胞，模拟机体内正常生理状态下生存的基本条件，让它在培养器皿中继续生存、生长和繁殖的方法。通过细胞培养可以获得大量的、性状相同的细胞，以便于研究细胞的形态结构、化学组成及功能和机制。

（一）细胞培养的全过程必须在无菌的环境下进行

细胞培养的全过程必须在无菌的环境下进行。为避免环境中的微生物及其他有害物质的影响，需要特殊的无菌室。无菌室应包括操作间和缓冲间两部分。操作间要求有供无菌操作的超净工作台、观察培养细胞的倒置显微镜、离心细胞的小型离心机及复苏细胞和预热培养基的水浴锅等。培养细胞所需要的氧和二氧化碳由接有二氧化碳钢瓶的培养箱提供。培养箱中充填二氧化碳的目的是用来缓冲和维持细胞培养基的 pH，提供适宜细胞生长的酸碱度。细胞生长的营养物质由培养基供给。目前常用基础培养基有 Eagle 氏培养基、RPMI-1640、DMEM 及 F12 培养基等。这些基础培养基虽然组成不尽一致，但都含有细胞所需要的氨基酸、维生素和微量元素等成分。基础培养基只能提供细胞生长的简单营养物质，细胞实际培养时，还需要添加一些天然的生物成分，其中主要是血清。血清含有

许多生长因子，促进细胞贴壁和增殖。不同的细胞培养需要选择不同的培养基。

（二）细胞培养的主要方式是原代与传代培养

体外培养的细胞可分为原代细胞和传代细胞。直接从体内获取的组织或细胞进行首次培养为原代培养（primary culture）；当原代细胞经增殖达到一定密度后，将细胞分散，从一个培养器以一定比例移到另一个或几个容器中的扩大培养，为传代培养（secondary culture）。传一次习惯上就称为一代。用这种方法可以重复传代数周、数月以至数年。但若反复传代，不仅会消耗大量的培养皿和培养基，而且传代次数的增加、在体外环境中的生长时间过长也会引起细胞特性的逐渐变化，特别是大部分组织来源的细胞不能在体外“永生”，因此，需要将培养的细胞及时冷冻在-196℃的液氮中长期保存，待需要时将细胞复苏后再培养。

（三）来源于体内的细胞可以在体外建系

多数原代培养的脊椎动物细胞，在体外经过有限次数的传代培养之后就会死亡。来源于人和动物正常组织的细胞，在体外传代次数一般不超过 50 代。例如，从胎儿中分离到的成纤维细胞可传 50 代，来源于成人肺组织的成纤维细胞只能传 20 余代。通常来源于恶性肿瘤组织的细胞能够在体外无限繁殖、传代，称为细胞系（cell line）。例如来源于宫颈癌组织的 Hela 细胞系，于 1951 年建立，至今仍在世界各地的实验室应用，成为“永生”细胞。正常组织培养的细胞在某些特殊条件下，如放射线照射、化学致癌物处理或癌基因转染等，也能形成“不死”的变异细胞，成为具有肿瘤细胞系性质的细胞。

在细胞建系过程中，无论是自肿瘤组织中分离的细胞，还是正常组织细胞经特殊诱导后产生的“不死”细胞，均需对其生物学特性加以鉴定。还可以用细胞克隆化（cloning）的方法进一步改善细胞系的均一性，即分离出单个细胞使之增殖形成细胞群（colony）。由此产生的细胞群称为细胞株（cell strain），它来源于一个克隆（clone），是一个具有相同性质或特征的培养细胞群体。

迄今世界上所建立的各种能连续传代的细胞系和细胞株达 5 000 余种。许多国家的研究机构均设有细胞库，随时可以供研究者使用。

经典实验：Hela 细胞的建系

背景知识

20 世纪 50 年代，组织培养技术已经有近五十年的历史，啮齿动物肿瘤细胞已在多年前由 W. Lewis 培养成功并保持着稳定的生长状态。当时的肿瘤学家非常渴望得到能够在体外无限生长的人类肿瘤细胞。有了这样的细胞就可以对肿瘤进行细致的可重复的观察，并可以用它为材料进行在人体无法进行的实验研究。当时肿瘤学家相信，获得人类的肿瘤细胞就可以找到治愈肿瘤的方法。尽管人们为此进行了大量的尝试，人类肿瘤细胞的培养在当时还没有获得成功。这种状况在 G. Gey 得到 Henrietta Lacks 的宫颈癌组织之后发生了根本转变。

实验内容

1951 年 2 月 1 日已有 5 个幼子的黑人妇女 Lacks 由于绝经并有出血来到马里兰州巴尔的摩的霍普金斯医院，为其进行检查的 H. Jones 医生发现 Lacks 的宫颈有一个柔软的、微紫色的肿瘤，取活组织进行病理诊断后确定为恶性。8 天后 Lacks 来到霍普金斯医院进行放射治疗，在治疗前她的肿瘤组织再次被取下了一些，这些组织被送到了霍普金斯医院组织培养研究负责人 G. Gey 的实验室。当时的组织培养实验室与现在迥然不同，没有超净工作台，Gey 和他的合作者，他的妻子 M. Gey，只能在本生灯（类似煤气

灯）火焰下的无菌区工作。没有商品化的合成培养基和已过滤除菌的不同类型的动物血清，Gey 进行组织培养前要去屠宰场从鸡心脏抽血以制备血浆，然后再去屠宰场取牛胚胎用来制备组织匀浆液，还要去产房吸取人脐带血，用这些混合物制备成培养基来支持组织细胞的体外生长。在 Gey 的妻子 M. Gey 极其小心谨慎地日复一日地养护下，Lacks 的肿瘤细胞开始在试管中生长，并表现出了旺盛的生命力。这些肿瘤细胞吸附在试管壁上，消耗着浸润着它们的培养液，由它们形成的细胞层越来越厚。肿瘤细胞的这些特性是已经进行了近 20 年人类细胞培养研究的 Gey 前所未见的。在使用胰蛋白酶消化，进行扩大培养后，Lacks 的肿瘤细胞持续性生长。1951 年 10 月 4 日 Lacks 辞世的那一天，Gey 在电视中宣布他获得了第一株可在体外培养条件下持续生长的人类的肿瘤细胞系，这株细胞系的名称就是 Henrietta Lacks 的头两个字母的组合——Hela。

后继影响

以 Hela 细胞为材料进行的实验研究为我们提供了大量的有关肿瘤细胞的基本知识，极大地提高了肿瘤生物学的研究水平。随着组织培养技术的发展，到 20 世纪 70 和 80 年代，数以千计的几乎囊括人体各种组织的细胞系被相继建立起来，并得到广泛应用。尽管如此，Hela 细胞在肿瘤和细胞生物学研究中的地位仍然无法取代，至今它仍然是世界范围内应用最广的肿瘤细胞之一。

（四）细胞融合可以产生杂交细胞

细胞融合（cell fusion）又称细胞杂交（cell hybridization），它是指细胞彼此接触时，2 个或 2 个以上的细胞合并形成一个细胞的现象。在自然情况下，体内或体外培养细胞间所发生的融合，称为自然融合；而在体外用人工方法（使用融合诱导因子）促使相同或不同的细胞间发生融合，称为人工诱导融合。

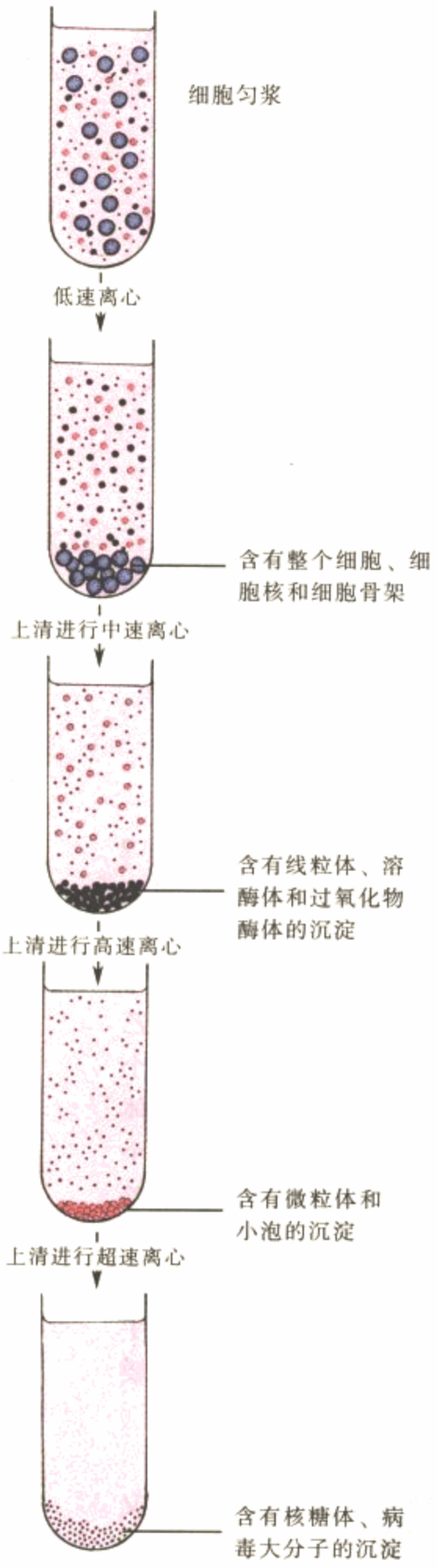
人工诱导融合中常用的诱导因子有：生物的（如灭活的仙台病毒）、化学的（如聚乙二醇）和物理的（如电融合）因子。细胞融合的结果，可形成双核或多核的细胞，含 2 个不同亲本细胞核的细胞称为异核体（heterokaryon）；含同一亲本细胞核的细胞称为同核体（homokaryon）。存活的异核体细胞通过有丝分裂，来自不同细胞核的染色体可合并到一个细胞核中称为合核体（synkaryon），也就是杂种细胞（hybrid cell），并且可通过选择培养等方法，筛选出所需的杂种细胞。

细胞融合的范围很广，从种内、种间、属间、科间一直到动、植物两界之间都获得成功。目前，这一技术已成为研究细胞遗传、细胞免疫、肿瘤和培育生物新品种的重要手段。利用细胞融合技术发展起来的杂交瘤（hybridoma）技术，是制造单克隆抗体的主要途径。

（五）胚胎干细胞需要在特殊的条件下培养

胚胎干细胞（embryonic stem cell，ESC）具有自我更新、增殖和多向分化的潜能，又称多能干细胞（pluripotent stem cell，PSC）。

ES 细胞的培养方法与已分化的成体细胞有相当大的不同，由于 ES 细胞具有快速增殖和多项分化的潜能，为获得全能性的 ES 细胞，在用培养基保证其生长扩增的同时，必须有效地阻止 ES 细胞的分化。因此，在使用常用培养基 MEM-delter、DMEM、TCM-199、F-12 等的同时，伴随使用饲养细胞层（feeder layer）。饲养细胞层是被阻断有丝分裂后的单层成纤维细胞，其分泌的成纤维细胞生长因子（fibroblast growth factor，FGF）等促有丝分裂因子可促进 ES 细胞的增殖，分泌的白血病抑制因子（leukemia inhibitory factor，LIF）等可抑制 ES 细胞的分化。也可以使用条件培养基（conditioned medium，CM）对其进行培



●图 3-8　用离心法进行细胞成分的分级分离

逐渐提高离心速度可以使细胞匀浆按成分分离。一般来说，亚细胞成分越小，所需离心力越大。图中所示各步离心的数值如下：低速：1 000g，10 分钟；中速：20 000g，20 分钟；高速：80 000g，1 小时；超速：150 000g，3 小时

养，条件培养基就是从某些培养细胞回收的培养液，其中含有能使 ES 细胞增殖和分化抑制的因子，用于制备条件培养基的细胞有 BRL、HBC-5637、PSA-1、PC10-6R 和 T3 细胞等。此外，也可以将饲养细胞层或条件培养基中的分化抑制因子（differentiation inhibitory activity，DIA）如 LIF 等分离纯化，单独或与饲养细胞层共同使用以维持 ES 细胞未分化状态和生长、增殖。

ES 细胞在体外分化抑制培养基中呈克隆状生长，细胞紧密聚集，形似鸟巢，细胞界限不清，克隆周围有时可见单个 ES 细胞和分化的扁平状上皮细胞，ES 细胞增殖迅速，每18~24 小时分裂增殖一次。

由于 ES 细胞的形态特征不明显，所以对培养的 ES 细胞的鉴定，主要根据 ES 细胞的标志酶（碱性磷酸酶）或抗原（SSEA-3、SSEA-4）以及 ES 细胞分化能力的检测。

第三节　细胞组分的分离和纯化技术

进行生化学分析往往要破坏细胞及细胞内部的微细构造而尽可能地保留各种细胞成分的固有功能。用分级分离的方法可以有效地分离不同的细胞器或大分子，本节将介绍细胞器和蛋白质的分离纯化技术。

一、细胞组分的分级离心

离心方法是分离和提取细胞亚显微结构和大分子的重要手段之一。它利用细胞内各种颗粒成分的大小、形状和密度不同，采用差速离心或密度梯度离心的方法将其分离。

破坏细胞有多种方法，但为了避免损伤细胞内的细胞器，多用物理的方法，如低渗透压、超声振荡、强制通过微孔、机械破碎或研磨等。这些方法使细胞膜及内质网膜等破裂成为断片，断片立即自我封闭形成小泡，而细胞内的各种细胞器如细胞核、高尔基复合体、线粒体、溶酶体、过氧化物酶体等基本不受损伤。其结果是，细胞悬浮液变成了包含各种细胞器及游离大分子的浓稠匀浆（homogenate）。这些细胞器、小泡及大分子的大小、电荷与密度都不相同。生物化学常常把由内质网形成的小泡称做微粒体（microsome）。

（一）差速离心分离体积、质量差别较大的颗粒

差速离心法（differential centrifugation）是分离细胞核与细胞器常用的方法。在密度均一的介质中，不同大小的颗粒沉降速度不同，颗粒越大沉降越快。低速离心时，大的组分如细胞核和没破坏的细胞很快沉降，在离心管底部形成小的沉降团块；在较高速度时，线粒体沉降成块；在更高速度加长时间离心，可以先收集封闭小泡，然后收集核糖体（图 3-8）。

由于离心沉降前，各种颗粒在介质中是均匀分布的，因而某

些慢沉降颗粒被裹到快沉降颗粒的沉降块中，如此分级分离所得到的分离组分纯度不高，再次悬浮小沉降块中的组分，反复离心可去掉杂质而纯化。

用 100 000g 超速离心匀浆，可以将各种细胞器及微粒体沉降，上清部分即为分布在细胞内的细胞器之间的液相成分，被称之为细胞质溶胶（cytosol）。细胞质溶胶是细胞内蛋白质合成及其他主要生化反应的场所，含有 RNA 及大量的蛋白。

（二）速度沉降分离沉降系数不同的颗粒

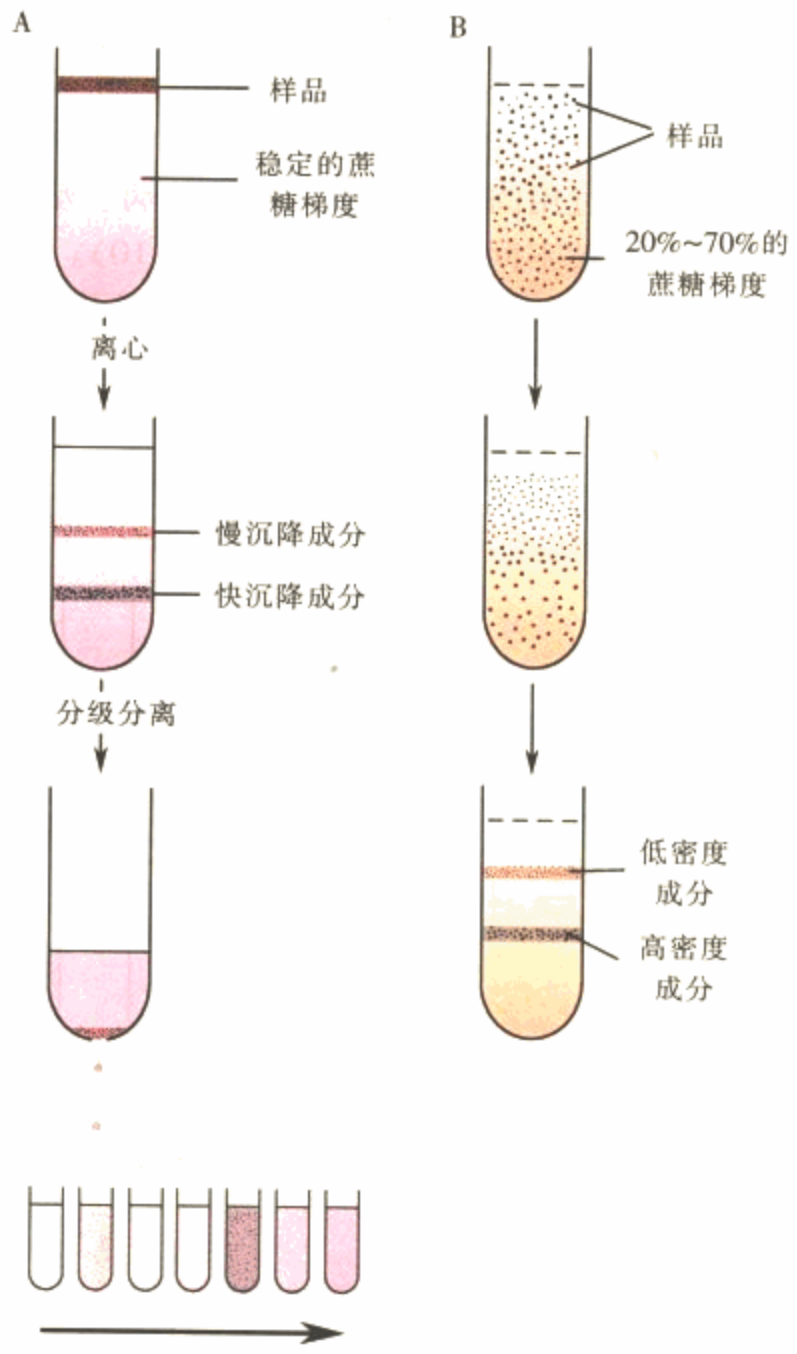
上述差速离心只能将那些大小显著不同的成分分开。速度沉降（velocity sedimentation）则可进行更精细的分离。分离方法是在离心管中加入稀盐溶液，将细胞的抽提液在盐溶液上覆一薄层。为防止对流混合，在离心管中制备由顶部到底部逐渐增加的蔗糖溶液的密度梯度（通常 5%~20%）。离心后混合物中的各成分以不同的速度沉降，形成不同的沉降带，各沉降带可分别收集（图 3-9A）。不同组分的沉降速率取决于它们的大小与形状，通常用沉降系数（S）值表示。许多细胞组分，如蛋白质和核酸的沉降系数在 1~200S 之间。目前超速离心机的转速可以达到 85 000 转/分，产生的离心力为重力的 600 000 倍。在如此巨大的离心力作用下，即使较小的生物分子，如 tRNA 分子和简单的酶分子都可根据它们的大小将其分开。

超速离心法可以根据生物大分子的沉降系数较精确的测定其分子量。

（三）平衡沉降分离密度不同的颗粒

另一种精密的超速离心分离方法是平衡沉降（equilibrium sedimentation）法，它取决于细胞成分的浮力密度，与大小形状无关。平衡沉降方法是在离心管中制备由顶部到底部高浓度差的蔗糖或氯化铯（cesium chloride）溶液密度梯度，可把细胞匀浆均匀分布在蔗糖或氯化铯介质中后超速离心。匀浆中的不同组分沉降至与自身等密度处时不再移动，形成沉降带，各沉降带再被分别收集（图 3-9B）。用这种方法可以将摄入与未摄入同位素 ^{13}C 或 ^{15}N 的同一种生物分子离心分开。用氯化铯制备密度梯度，进行平衡沉降的方法 1957 年被开发，因分离细菌中 ^{15}N 标记 DNA 与非标记 DNA 而直接证明了 DNA 是半保留复制，使这一实验成为历史性的实验。

通过对经超速离心分离得到的细胞器及其他亚细胞成分的研究，可以确定各种细胞器及细胞成分的功能。例如，用离心纯化的线粒体和叶绿体进行实验，得知这些细胞器在能量转换中的重要作用。同样，分离由粗面内质网或滑面内质网的断片形成的封闭颗粒，将其作为研究粗、滑面内质网功能的模型也取得了很好的效果。从分级分离得到的具有生物功能的细胞抽提物称为非细胞体系（cell free system），广泛应用于细胞生物学研究。



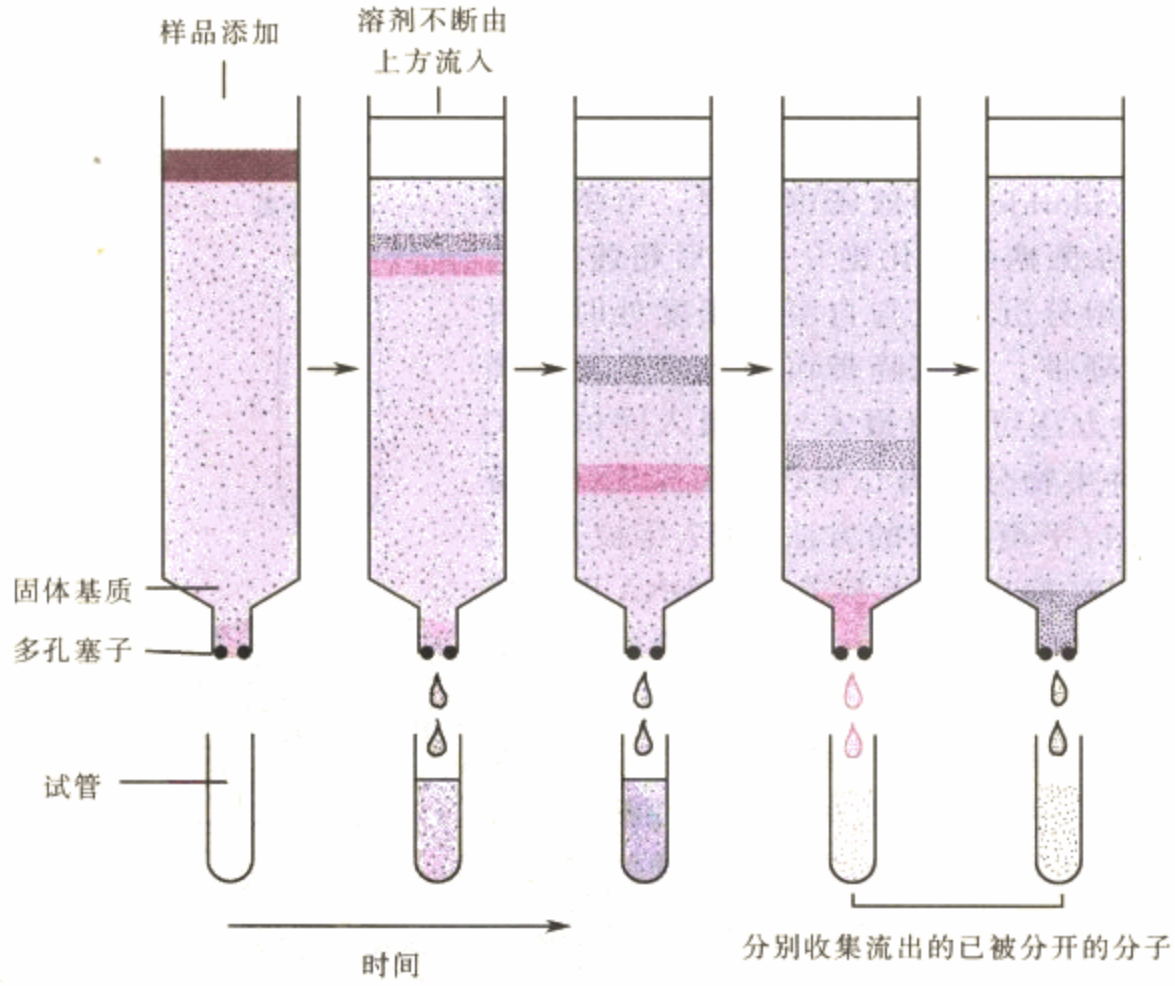
●图 3-9　速度沉降和平衡沉降离心的比较

在速度沉降（A）中，亚细胞成分样品置于含有蔗糖的稀溶液上层，根据其大小与形状以不同速度沉降。为稳定沉降带，离心管内由上至下需制作成 5%~20%的连续蔗糖梯度；在平衡沉降（B）中，离心形成蔗糖密度梯度（用更高梯度的氯化铯分离蛋白与核酸分子效果更好），亚细胞成分根据自身的密度或升或降，以达到与蔗糖同样密度的位置

二、层析法分离蛋白质

将蛋白质进行分级分离并最终进行纯化，常常需要综合运用多种分离手段才能够完成，包括盐析、有机溶剂沉淀、各种常规层析、高压液相层析（high performance liquid chromatography，HPLC）等。要根据目的蛋白质在起始原料中的含量，蛋白质分子量的大小，蛋白质的理化性质及检测方法来摸索、选择合适的途径。层析技术最初是被开发用来分离糖、氨基酸等小分子的，是一种分配层析，操作简单，现在仍被广泛应用。其主要步骤是：将一滴样品点在吸收材料上（如为滤纸则为纸层析，如为覆盖着薄层纤维素或硅胶的塑料板或玻璃板，则成为薄层层析），然后将点样的一端浸于一种混合溶液当中（如水与乙醇）。随着溶剂的向上移动，样品中的分子就按照其在两种溶剂中的溶解度的不同而分开。由于两种溶剂对于吸收材料的吸附程度不同，移动速度也不同。那些易于溶解在强吸附溶剂中的分子移动缓慢，而易于溶解于弱吸附溶剂中的分子移动快，经过一段时间后不同的分子即可完全分开，经干燥后显色来确认不同分子的存在。

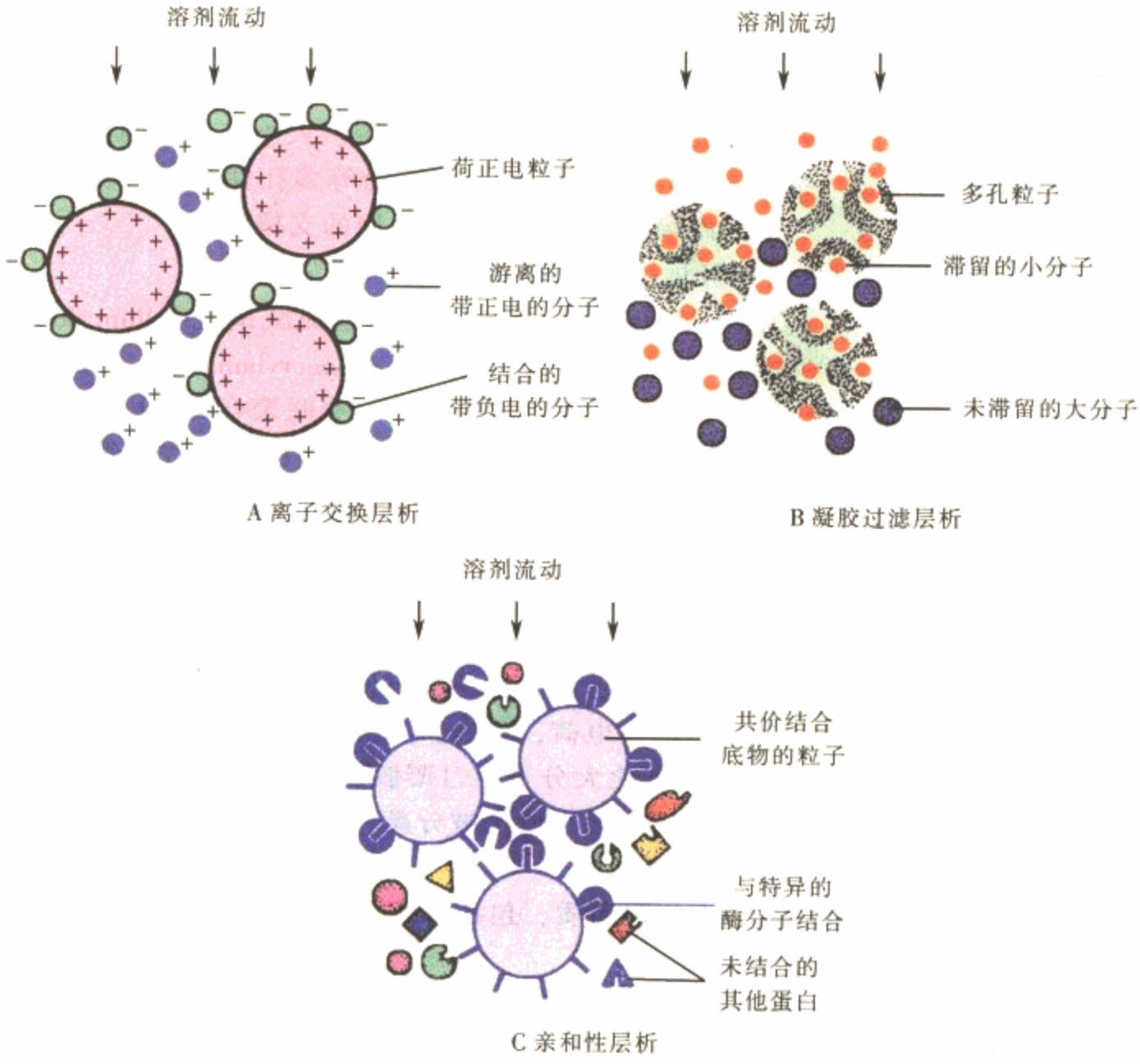
对蛋白质的分离纯化最常用柱层析（column chromatography）。方法是将蛋白质混合液通过用固体性颗粒充填的玻璃、塑料或不锈钢柱，不同的蛋白质因与颗粒相互作用的不同而被不同程度地滞留（图 3-10）。当它们从柱的底部流出时，可被分别收集。根据所选择的充填颗粒的不同，常用的柱层析可以分为：①离子交换层析：充填颗粒带有正电或负电，蛋白质按其表面电荷的分布而被分离（图 3-11A）。②凝胶过滤层析：层析柱装满多孔性的凝胶颗粒，根据蛋白质的大小将之分离。当样品流过多孔性凝胶颗粒时，小分子易



●图 3-10　柱层析法分离不同的成分

将含有多种成分的样品添加到充满浸没于溶剂的固体基质（如纤维素）的圆形玻璃柱或塑料柱的顶部，随后，大量溶剂缓慢流过柱子，将底部流出的液体分别收集于不同试管。由于不同样品成分在柱中的移动速率不同，因此可以分离后收集于不同的试管

不断进入颗粒内部的小孔，移动受到延迟，而较大分子则易随着溶液在凝胶颗粒之间流过，能更快地通过柱，最早流出。可以根据蛋白分离的需要选择不同孔径的多孔性凝胶颗粒。凝胶过滤层析不但可以分离蛋白质，而且可以测定蛋白质分子量的大小（图 3-11B）。③疏水性层析：将疏水性基团共价结合在充填颗粒上，蛋白质根据表面疏水领域强弱的不同，流出的速度也不同。④亲和性层析：把能够与蛋白质表面的特定部位进行特异性结合的分子共价连接于惰性多糖类颗粒上，如酶的底物、特异性抗体或抗原（图 3-11C）。这种方法最为有效，有时一次过柱可将样品纯化几千倍，得到非常纯的蛋白质。特别是经基因重组后在原核或真核细胞表达的蛋白质，多带有一段特殊的氨基酸序列标签（tag），该标签能与附着在凝胶颗粒上的特定成分亲和，可以得到非常好的分离纯化效果，是现在分离纯化表达蛋白最常用的方法。



●图 3-11　三种层析用的基质

在离子交换层析（A）中，不可溶的基质上的荷电离子阻滞带有相反电荷分子的移动。可溶性分子与基质结合的强度取决于各自的离子强度与溶液的 pH；在凝胶过滤层析（B）中，基质是惰性的多孔粒子，能够进入基质的小分子因旅程长而溶出延迟。根据多孔粒子孔径的大小可以分离分子量 500~5×10^6 的分子；亲和性层析（C）中特异配体，如抗体、酶底物等，被共价连接在基质上以结合特定蛋白。当被固定的底物与酶分子特异结合后，酶分子可以被高浓度的游离底物重新溶出。而与固定抗体结合的蛋白，可以用高盐溶液或高、低 pH 溶液使抗原-抗体复合体分离而使抗原蛋白溶出。仅通过一个亲和层析柱，常可以得到高纯化物

值得强调的是，由于蛋白质的结构、理化性质的复杂多样性，除了带有特殊标签的人工表达蛋白质以外，很难找到针对某种特定蛋白质的特异性亲和层析法。因此，大部分蛋

白质的分离纯化需要多种方法，包括多种柱层析法的组合，才能够达到目的。

普通柱层析法由于充填颗粒的不均匀等因素，使通过柱的液相流量不均，导致分离能力下降。高压液相层析是将直径在 3~10μm 之间的微小球型树脂（通常为硅胶树脂）用特殊的装置均匀充填在层析柱中。由于颗粒小充填紧密，必须加高压才能使液相流过。高压液相层析所用层析柱多为不锈钢柱，分离时间短、效率高，可用来分析各种大小分子，但所需仪器精密，造价高。

各种层析方法包括高压液相层析，大多可以维持蛋白质不发生变性，保持蛋白原有的功能。而高压液相层析的反向层析柱常常被用来分离小分子蛋白以及被酶或化学试剂切断的蛋白质多肽混合物，根据多肽亲疏水性特点，流动相采用梯度有机溶剂。

三、蛋白质电泳

由于氨基酸带有正电荷或负电荷，蛋白质往往带有净正电荷或净负电荷。将含有蛋白质的溶液加上电场，蛋白质分子就会按照它们的净电荷多少、大小及形状的不同在电场中移动，这一技术称为电泳（electrophoresis）。最初，用淀粉等多孔性基质为支持体，分离水溶液中的蛋白质混合液。后来，丙烯酰胺逐渐成为最常用的支持体。

（一）SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳依据分子量的不同分离蛋白质

20 世纪 60 年代中期，利用阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠（sodium dodecyl sulfate，SDS）进行改良的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS polyacrylamid gel electrophoresis，SDS-PAGE），成为常规的蛋白质分析方法。使单体丙烯酰胺交联聚合成聚丙烯酰胺凝胶作为蛋白质在其中移动的支持体，根据需要通过配制不同浓度的凝胶而控制凝胶孔径的大小。先将待分离的蛋白质样品置于 SDS 溶液中，SDS 的疏水端与蛋白质的疏水区结合，其带负电荷的亲水端互相排斥，使折叠的蛋白质分子展开成为伸展的多肽链（图 3-12）。此外，常常加入 2-巯基乙醇（2-mercaptoethanol，2-ME）或二硫苏糖醇（dithiothreitol，DTT）类的还原剂，使蛋白质中所有的二硫键断裂。SDS 加还原剂的处理使蛋白质分子失去与其他蛋白质或脂质成分的联系而游离地溶解于溶液当中，也使蛋白质自身的亚单位之间的连接分开。由于所有蛋白质都带有大量的负电荷，蛋白质自身原有的电荷可以忽视，电场中所有蛋白质都向正极迁移，其中小分子比大分子通过凝胶网孔要容易得多，因而迁移快。结果，复杂的蛋白质混合物完全按分子量大小依次被分离，经染色后可以观察到整齐排列的条带（图 3-12）。

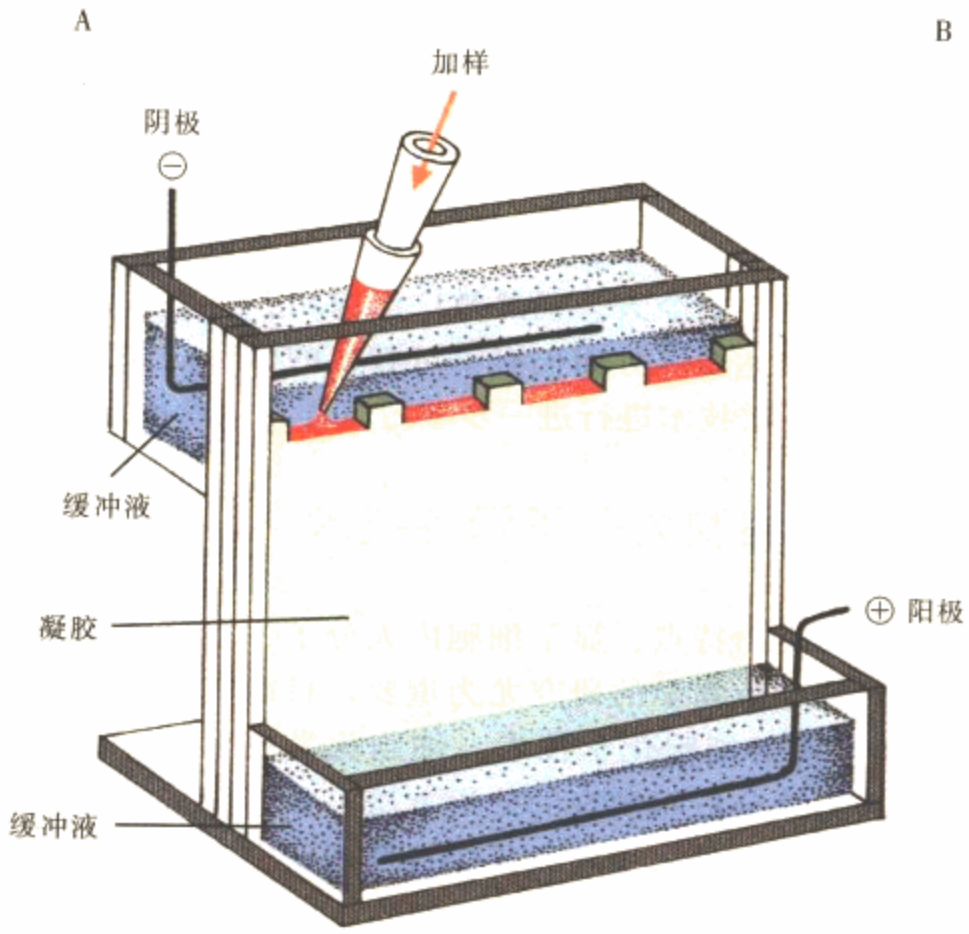
SDS-PAGE 适用于分析各个种类的蛋白质，包括不溶于水的蛋白质。但由于是变性条件下的分离，它们的功能多已丧失。

（二）等电聚焦电泳依据等电点不同分离蛋白质

蛋白质是否带电荷，是带正电荷还是带负电荷，是由溶液的 pH 决定的。当溶液在某一 pH 条件下使某一蛋白质不带电荷时，这个 pH 就是这种蛋白质的等电点（isoelectric point）。所有的蛋白质都有自己特定的等电点，由于不带电荷，在电场中就不会移动。等电聚焦（isoelectric focusing）电泳是在丙烯酰胺凝胶两端形成电场，使含有不同等电点的两性电解质（ampholyte）在电场当中形成 pH 梯度，样品中所有的蛋白质在电泳时都向自己的等电点处移动，最后聚集、静止于各自的等电点。等电聚焦电泳分离效果很好（图 3-13）。

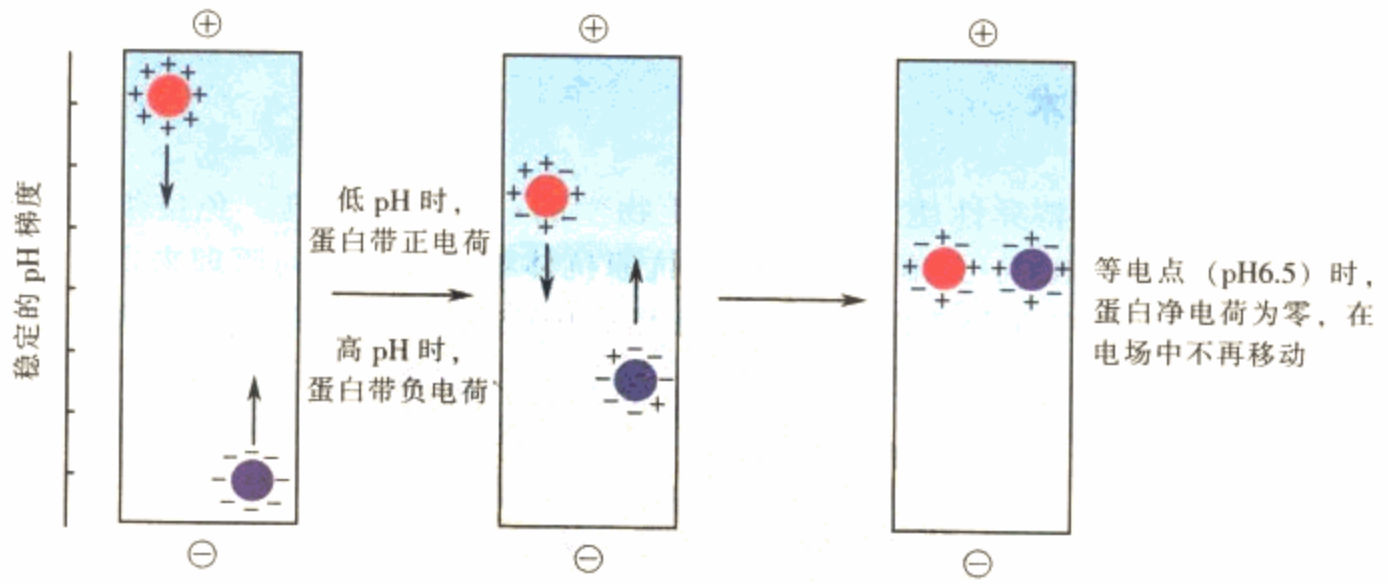
（三）双向电泳可一次分析数千种蛋白

单一方向的蛋白质电泳，不管是 SDS-PAGE 还是等电聚焦，都难免有许多蛋白质由于分子量或等电点的相近或相同而导致相互重叠。把等电聚焦与 SDS-PAGE 结合进行双向电



●图 3-12　SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）

A. 电泳装置　B. 单个多肽链与荷负电的十二烷基磺酸钠（SDS）分子形成复合物，因此，荷负电的 SDS-蛋白复合物在多孔聚丙烯酰胺凝胶中向阳极移动。在这种条件下，多肽的分子量越小，移动速度越大，因此这种技术可被用于确定多肽链和蛋白亚基的分子量。但是，如果蛋白含有大量碳水化合物，那么该蛋白在凝胶中的移动速度不规范，用 SDS-PAGE 测得的表观分子量将不准确



●图 3-13　等电点电泳分离蛋白质

低 pH（高 H^+浓度）时，蛋白质的羧基倾向于不带电荷（—COOH），含氮碱性基团带正电荷（如—NH_3^+），使大部分蛋白质净电荷为正。高 pH 时，蛋白质的羧基带负电荷（—COO^-），碱性基团倾向于不带电荷（如—NH_2），使大部分蛋白质净电荷为负。在一个蛋白质的等电点时，正负电荷平衡，所带净电荷为零。因此，电场中管状凝胶形成一个固定 pH 梯度时，每种蛋白质都移动至它的等电 pH，聚集成一条带

泳能够产生十分好的分离效果。

方法是先在长条状凝胶介质中进行等电聚焦电泳，然后将凝胶条横放于聚合好的平板SDS-丙烯酰胺凝胶上再进行垂直电泳。

普通实验室自制的凝胶进行双向电泳可以辨认千种以上不同的蛋白质，使用商业化的条状等电点凝胶及平板 SDS-丙烯酰胺凝胶加上相应的仪器设备，可以使分辨数量及效果大大增加。双向电泳法在蛋白质分析技术不断进步的今天，仍然被广泛应用，特别是在初步筛选、分析正常与异常组织、细胞中蛋白质表达情况方面仍有不可替代的作用。双向电泳显现的差异蛋白质条带或点（spot），常常用质谱技术进行进一步鉴定（详见本章第五节）。

第四节　细胞化学和细胞内分子示踪技术

形态与功能相结合是细胞生物学研究的突出特点，显示细胞内大分子、小分子甚至是无机离子在细胞内分布的分子示踪技术对细胞生物学的研究尤为重要。目前实验室普遍应用的细胞内分子示踪技术是基于光镜和电镜的细胞化学技术。细胞化学技术（cytochemistry technique）是一类将细胞形态观察和组分分析相结合的分析方法，是在保持组织原有结构的情况下利用生物大分子、小分子、无机离子的物理、化学特性来研究它们在细胞内的分布、数量及动态变化，包括酶细胞化学技术、免疫细胞化学技术、原位杂交技术、放射自显影技术等。随着检测分析仪器的进步和以荧光染料为代表的活体染料的广泛使用，细胞内的分子示踪技术已经能够对活细胞内的分子进行实时的动态观察。

一、酶细胞化学技术

酶是细胞绝大多数生命活动过程的最终执行分子，细胞内各种酶的分布和活性变化，如蛋白激酶、蛋白酶、过氧化物酶等，反映了细胞的生理状态和病理状态的变化。酶细胞化学技术（enzyme cytochemistry）就是通过酶对特异底物的反应并显色来检测酶在器官、组织和细胞内的分布及酶活性强弱的一种技术。酶细胞化学反应的基本原理是将酶与其底物共同孵育，然后使产物与显色剂反应生成荧光分子、有色可溶性化合物、有色沉淀或高电子密度沉淀，最后通过光度计、光镜、电镜等进行检测和观察。

二、免疫细胞化学技术

抗体对抗原的严格特异性使之成为细胞生物学的一种有力工具。免疫细胞化学技术（immunocytochemistry，ICC）是利用免疫学中抗原抗体特异性结合的原理来定性和定位研究器官、组织和细胞中的生物活性大分子的技术。用荧光染料标记的抗体，在荧光显微镜下，可以对细胞中的特殊分子进行定位。将电子密度高的胶体金标记抗体，则可在电镜下高分辨观察特定分子的分布情况。为了提高检测其灵敏度，可以将荧光物质或酶类标记与一级抗体结合的抗体（二级抗体），而不是标记与抗原直接反应的抗体（一级抗体）。每个一级抗体上可以结合多个二级抗体，因此进行荧光检测或酶与底物的显色反应，可大大增加信号的强度。

三、放射自显影技术

天然存在的元素，大多是同位素的混合物。同位素间尽管核重量不同，但核外电子数

相同，化学性质也相同。放射性同位素（radioisotope）的核不稳定，随机衰变成为另一种原子的同时，释放出 α、β 或 γ 射线。放射性同位素很少天然存在，需在原子炉中用高能粒子轰击原子产生。生物学研究中常用的放射性同位素有 ^{32}P、^{131}I、^{35}S、^{14}C、^{45}Ca、^{3}H 等。放射线可以用几种不同方法检测。如果是β 粒子可以用盖革计数器或液体闪烁计数器定量计数。常常用这种方法对生物样品中放射性同位素标记的某种分子进行定性或定量检测。

放射性自显影技术（autoradiography）是用放射性同位素标记生物样品中的大分子或其前体物质，然后通过乳胶感光（卤化银还原成为银原子），显示出被标记物在组织和细胞内的位置、数量及其变化。在放射性同位素实验中常用的 ^{14}C、^{3}H、^{35}S 是弱 β 放射性同位素，^{32}P 是强放射性同位素。实验中常以 ^{3}H-亮氨酸和 ^{35}S-蛋氨酸标记蛋白质，用 ^{3}H-岩藻糖和 ^{3}H-甘露醇标记糖类，^{3}H-胸腺嘧啶脱氧核苷、^{3}H-胸苷或 ^{3}H-尿苷标记核酸。放射性自显影技术的具体操作步骤是：首先，用注射、掺入、脉冲标记等方法将放射性化合物渗入活细胞，培养不同时间后取样固定，制备光、电镜切片；在暗盒中把感光乳胶覆盖在切片上存放数日。由于放射性同位素衰变使乳胶感光（自显影过程），经过显影和定影，根据银盐颗粒所在位置即可知道细胞中放射性物质的分布情况。例如，用放射性前体 ^{3}H-胸苷，^{3}H-尿苷分别脉冲渗入培养细胞，显示 DNA 是在细胞核中合成并保留在核内，而 RNA 最初在细胞核内合成，然后很快积累于细胞质中。放射自显影是一种很灵敏的技术，在适宜的条件下几乎能检测出放射性原子的每次衰变，在细胞生物学研究领域中曾经发挥并且还在发挥着重要的作用。

四、活细胞内分子示踪

普通的细胞化学技术虽然能反映出细胞内生物分子的存在位置及其与细胞功能的关系，但这种技术在应用过程中通常是观察固定后的细胞内的分子分布情况，与活细胞中分子的分布存在一定距离。活细胞内的分子示踪则克服了这一缺点，近些年来被广泛应用于细胞的生理功能研究。

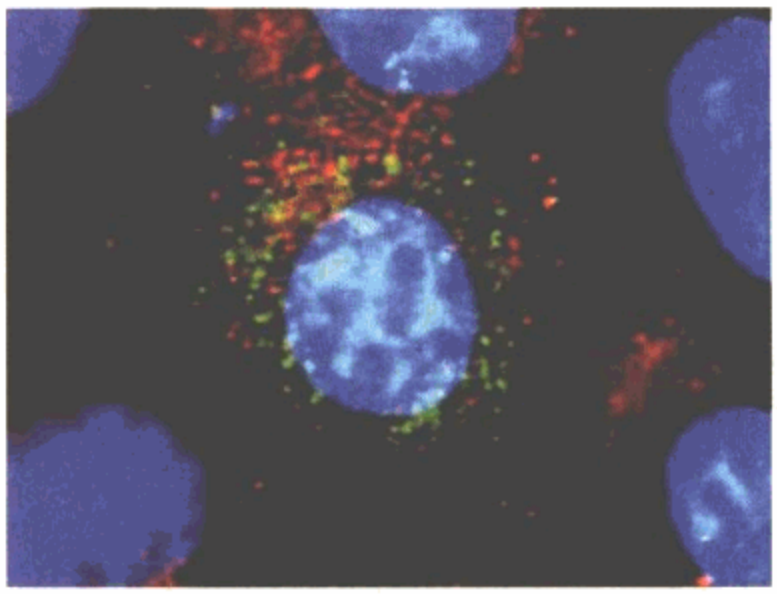
（一）离子探针进行细胞内离子的实时检测

细胞内离子有着重要的生理功能，它们有的是信号转导的信使（如钙离子），有的是酶催化所必需的（如钠、钾、钙、镁、铜、铁、锌、锰等离子），有的通过离子通道跨膜转运影响膜电位（如钠、钾等离子），有的则促进膜的融合（如钙离子）。细胞内离子的实时检测将揭示一些生理过程的机制。一些染料专一地与某种离子结合后会产生荧光或改变本身荧光的发射波长与强度，从而通过荧光检测可以显示该离子的量。通常称这些染料为离子探针。如果将它们导入细胞内，就能在时间与空间上显示活细胞内某种离子的动态变化。

（二）绿色荧光蛋白常被用于显示特定蛋白在细胞内的定位

绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）是应用最广泛的研究蛋白质亚细胞内定位的报告分子。GFP 最初从水母中分离，含有 238 个氨基酸残基，是一种构象很稳定的蛋白质。它不含辅基，也不需要辅助因子，在蓝色光源（450~490nm）的激发下，发射出绿色荧光（520nm）。*GFP* 基因可以很容易地导入到其他种类的细胞当中去表达。构建绿色荧光蛋白基因与目的蛋白基因的融合基因表达载体，转染特定的细胞，可以在荧光显微镜或者是共聚焦显微镜下观察目的蛋白质在细胞内的位置及随时间变化情况。

在大部分情况下，所表达的融合蛋白的状态是由目的蛋白决定的，也就是说融合蛋白中的 GFP 仅仅是一个标记物，不影响另一部分目的蛋白在细胞内的真实定位。同样，也可以将一些细胞定位信号肽附加到 GFP，以引导 GFP 直接定位于信号指定的细胞器。如



●图 3-14　辅酶Ⅱ依赖性视黄醇脱氢-还原酶选择性剪接体（B1 蛋白）在 Hela 细胞中的定位（汕头大学黄东阳提供）

图中绿色荧光为 GFP 融合的辅酶Ⅱ依赖性视黄醇脱氢/还原酶选择性剪接亚型 B1（NRDRB1），显示 NRDRB1 在 Hela 细胞内的分布。红色荧光显示 Hela 细胞中过氧化物酶体分布。该图说明 NRDRB1 部分定位到过氧化物酶体

一些蛋白质羧基末端（C-端）的最后三个氨基酸-SKL（丝氨酸-赖氨酸-亮氨酸）是过氧化物酶体（peroxisome）的定位信号。用基因重组的方法将 GFP C-端连接一段带有 C-端-SKL 的短肽，并在不同真核细胞中表达，可以观察到不同细胞过氧化物酶体的特征（图 3-14）。

通过点突变的方法研究 GFP 的结构与功能，发现一些突变蛋白的光吸收与荧光行为发生改变，由此开发出多种不同颜色“GFP”。目前常用的有不同激发光与发射光谱的“GFP”包括 GFP、黄色荧光蛋白（YFP）、青色荧光蛋白（CFP）、蓝色荧光蛋白（BFP）等。此外还有相应的荧光强度较大的增强绿色荧光蛋白（EGFP）、增强黄色荧光蛋白（EYFP）、增强青色荧光蛋白（ECFP）等，其中 EGFP 与 GFP 的不同在于有 F64L 和 S65T 两个点突变。

细胞的信号传递过程、酶的失活或激活过程、受体和配体的结合等重要的分子事件都依赖于蛋白与蛋白的相互作用。虽然 GFP 的融合蛋白能够提供许多信息，也可以研究几种蛋白质的细胞内共定位，但不能给出蛋白与蛋白有直接相互作用的证据。此时，荧光共振能量转移就有了广泛应用。

（三）荧光共振能量转移可实时观察细胞内蛋白与蛋白相互作用

细胞内蛋白质发挥功能的主要方式之一是不同蛋白质之间的相互作用并形成复合物，荧光共振能量转移是检测蛋白质之间相互作用的新方法。荧光共振能量转移（fluorescence resonance energy transfer，FRET）是一种量子力学现象，当一个荧光供体与一个荧光受体分子彼此接近而供体的发射光谱与受体的激发光谱重叠时就会发生 FRET 现象，此时能量以非辐射的方式由供体转移到受体。其直观表现是：供体荧光和受体荧光之间靠近达到合适的距离时，如果以供体的激发光激发，供体的荧光强度则比它单独存在时要低得多。目前常用的 FRET 荧光染料对主要有 Cy3-Cy5、Alexa546-Alexa647 和 Texas Red-Tetramethyl-rhodamine 等；而供体和受体均为荧光蛋白的包括 CFP-YFP、BFP-EGFP 等。

细胞生物学中早期 FRET 的研究多以生物分子的荧光类似物或在生物大分子上以共价或非共价方式耦联上一个荧光基团作为荧光供体或受体。在把 GFP 引入到基于 FRET 的显微映象研究后，可以实时观察细胞内蛋白与蛋白相互作用、生物大分子构象变化，极大地促进了细胞内实时反映动态分子过程的研究。

（四）单分子示踪是准确研究大分子功能的方法

单分子荧光成像（single molecular fluorescence imaging）和原子力显微镜是活细胞体系中单分子研究的两种核心技术。

单分子荧光成像具有较高的时间分辨率，对细胞在生理活性条件下的检测比其他技术更为成熟，是目前用于活细胞中单分子研究的最重要的一种方法。与普通荧光技术相比，单分子荧光成像技术具有样品激发范围小、光子收集效率高、采用高量子产量高信噪比荧光基团及低本底荧光的特点。目前单分子荧光成像技术可以采用全内反式荧光显微镜（total internal reflection fluorescence microscope，TIRFM）和共焦激光扫描显微镜进行成像。目前已报道的活细胞单分子荧光成像在细胞生物学研究中的应用包括研究配体与受体的结合、蛋白质的聚合和解聚、蛋白、mRNA 等生物大分子的动力学行为及蛋白、病毒的

示踪等。

原子力显微镜能够在溶液和室温下进行操作，分辨率高，非常适合于在生理条件下显示生物分子的特异性相互作用。实现活细胞中分子（如受体-配体）的相互作用的单分子力测量一直是原子力显微镜的应用目标，但目前存在的困难有：细胞固有弹性的影响，目标分子易于从细胞膜上拉下来，受体-配体密度过低而难形成有效的相互作用，影响测力因素过多导致结果难以解释，以及针尖易被污染等。因此，尽管在单分子水平上的研究很多，但是真正在活细胞上实现的很少。近几年来，在活细胞原子力测量方面不断出现新的成果，主要集中在血液凝集、白细胞黏附等细胞黏附性质的研究上。

尽管活细胞单分子行为的研究目前仍处于起步和探索性阶段，其应用还主要限于简单的分子以及已经研究的比较成熟的简单生物学问题，但是不难看出活细胞单分子行为及实时检测研究是生命科学向微观世界深入探索的一个重要标志。

第五节　细胞功能基因组学研究技术

现代细胞生物学强调在基因与蛋白质等分子水平上理解细胞的功能。近些年来，有关分子水平的操作技术取得了长足进展，将深入影响到我们对细胞的结构与功能的认识。在这里简要介绍目前在细胞生物学研究中常用的分子技术。

一、基因的基本研究技术

过去，DNA 分子贮存的信息只能通过遗传学调查来研究，即从变异生物或其子孙的表现型推断基因的功能。到 70 年代初为止，长长的双螺旋链，4 种核苷酸单调排列的 DNA 分子对生物学者来说，是细胞内物质中最难分析的分子。今天遗传学调查的方法仍然十分有效，但随着一系列有关 DNA 的分子生物学实验技术的出现，DNA 分子成为细胞内最容易分析的分子。遗传物质的直接操作与详细的化学分析成为可能，使遗传学研究变得容易了许多。另外，这些技术的应用，使得我们能够大量得到细胞内的微量蛋白质，使蛋白质的构造与功能的生化学研究发生了根本性的变革。

（一）限制性核酸内切酶可在特定位点切断 DNA 分子

许多细菌为了保护自己，能够产生限制性内切酶（restriction nuclease）以切断病毒入侵带来的 DNA 分子。这类酶通常识别 DNA 分子内由 4~8 个碱基构成的特定序列的酶切位点，这些酶切位点大多是“回文（palindrome）”序列，即两条链顺反都是一样的碱基序列。而细菌自身基因组中同样序列则通过 A 或 C 处甲基化得以“伪装”，免于被切断。现在从各种细菌中已分离出数百种限制性核酸内切酶。

许多限制性内切酶是在酶切位点的不同切口处切断双链 DNA 的，产生两个碱基互补的短单链突出末端，被称为粘性末端（cohesive end）。任何互补的粘性末端都能很容易地连接在一起。相比之下，另一些限制性内切酶在 DNA 双链的同一切口处切断 DNA，产生的双链末端被称为钝性末端或平滑末端（blunt end）（图 3-15）。

限制性内切酶是 DNA 克隆、基因工程必不可少的工具。

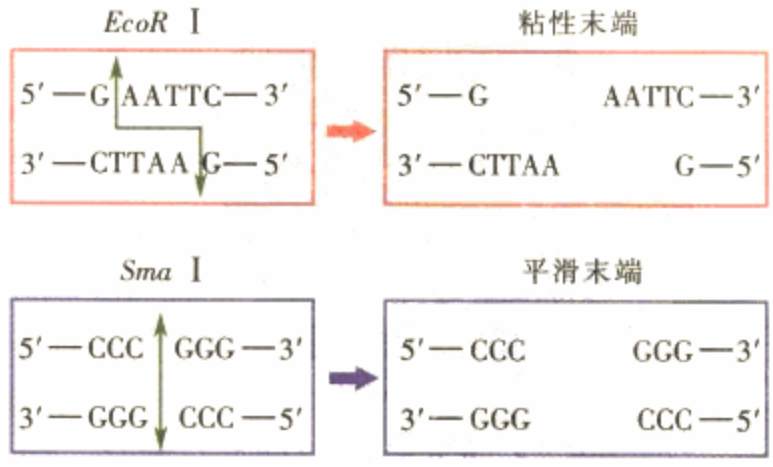


图 3-15　两种限制性内切酶

限制性内切酶在识别序列或附近切割 DNA 双链。*EcoR* Ⅰ切割后产生粘性末端，*Sma* Ⅰ切割后产生钝性末端

（二）核酸凝胶电泳分离不同大小的 DNA 分子

与蛋白质电泳相比，核酸电泳更简单。因为核酸分子中的每个单核苷酸都带有一个负电荷，在碱性条件下向阳极移动，故可以按照其构成碱基数的多少被有效地分离。核酸电泳常用的支持体为琼脂糖（agarose）与丙烯酰胺（acrylamide）。

琼脂糖凝胶电泳操作简单，电泳速度快，样品不需事先处理就可直接进行电泳，结果观察方便。但琼脂糖凝胶电泳分辨率相对较低，不适合分离 100 碱基以下的核酸分子。可根据待分析核酸分子的大小调节琼脂糖浓度，多用 0.6%~2.0%的琼脂糖凝胶分离 20~0.1kb 的线状核酸分子。

丙烯酰胺凝胶电泳分辨率高，一般多用于 500 碱基以下的 DNA 分子片段的分离与测序，可以将两条仅相差一个碱基的 DNA 片段分开。根据需要，可用浓度 5%~20%的丙烯酰胺凝胶分离 DNA 片段。与琼脂糖凝胶电泳相比，丙烯酰胺凝胶电泳整个操作过程显得有些复杂，所需时间较长。

（三）聚合酶链式反应对特定的 DNA 序列进行重复性复制

聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）是在体外对特定的 DNA 序列进行的重复性复制反应（扩增）。其反应体系包括：模板 DNA、耐热的 DNA 聚合酶、引物、4 种脱氧核苷酸（dNTP）及适当的反应缓冲液。引物（primer）是 DNA 复制反应时所需要的一对寡聚 DNA 分子，为待扩增 DNA 分子双链 5′端的 18~30 个碱基序列，根据需要人工合成。PCR 反应多分三步骤进行：①DNA 双链解离；②DNA 链与引物的退火；③DNA 聚合酶作用下的互补链合成。此三步骤重复 20~30 次即可完成扩增反应。第一步的 DNA 双链解离在 95℃进行；第二步退火，即引物与 DNA 链的互补结合大多在 45~65℃之间进行，而第三步合成延伸反应多在 72℃进行。PCR 扩增的 DNA 长度一般在 2 000 碱基以内，但选择好最适条件、引物及聚合酶，10 000 碱基的扩增有时也是可能的。

（四）DNA 文库和基因克隆是生物学实验室常用的工具和手段

同一限制性内切酶切割产生的互补粘性末端可轻易连接起来，因此任何生物的 DNA 片段都可以插入到能够提供特定的酶切位点并能进行自我复制的 DNA 分子——质粒（plasmid）或噬菌体（phage）中，进而将这些含有插入 DNA 的质粒或噬菌体导入细菌，形成克隆。每个克隆可以使所插入的 DNA 断片无限增殖，这个过程被称之为 DNA 克隆（DNA cloning）。克隆过程中所用的质粒或噬菌体被称为克隆载体（cloning vector）。作为插入断片的 DNA 可以是来自生物的各种组织的基因组 DNA、mRNA 逆转录形成的 cDNA 或通过体外聚合酶链式反应得到 DNA 分子。

基因组 DNA 克隆（genomic DNA clone）人染色体 DNA 约 3.2×10^9 个碱基，用 *EcoR* Ⅰ完全分解，可得到平均 4 000 碱基的断片 80 万种，将这些断片插入到 λ 噬菌体后进一步可以得到同样数目的细胞克隆。这些包含了人染色体的全部基因的克隆可以作为基因文库（gene library），从中筛选出所需 DNA 断片的克隆。

cDNA 克隆（cDNA cloning）以细胞质内的 mRNA 为材料，通过逆转录酶合成与 mRNA 互补的 DNA 单链（complementary DNA，cDNA），再进一步合成双链 cDNA。把全部双链 cDNA 插入适当的克隆载体进行克隆，制成 cDNA 文库（cDNA liberary）。通过筛选 cDNA 文库，寻找出含有目的基因的克隆，并将克隆化的 cDNA 碱基进行序列分析以得到其所编码的整个蛋白质序列，这一系列过程被称之为 cDNA 克隆。简单地说，将某一 mRNA 的复制品 cDNA 克隆化，分析得到其编码蛋白质的全长碱基序列的一系列操作步骤就叫 cDNA 克隆。现在，确定一个 mRNA（cDNA）分子的全碱基序列，也可以不用筛选 cDNA 文库的方法，而是利用部分已知序列通过 PCR 的方法向 cDNA 的 3′末端与 5′末端分别扩增从而得到整个 cDNA 序列。

PCR 扩增后的双链 DNA 分子可直接插入克隆载体进行克隆，这已成为分子生物学研究工作的常规实验。

（五）测定 DNA 序列的基本方法是双脱氧链末端合成终止法

目前，最常使用的四色荧光自动化测序，是基于 Sanger 建立的双脱氧链末端合成终止法的基本原理。

在正常的 DNA 体外反应过程中，加入的核苷酸单体为四种脱氧核苷三磷酸（dATP、dCTP、dGTP、dTTP）。在反应体系中，引物与模板退火形成双链区后，DNA 聚合酶便结合到 DNA 双链上，沿 5′→3′的方向移动，利用 4 种脱氧核苷三磷酸（dNTP）合成一条与模板链互补的 DNA 新链。Sanger 法的基本原理是，利用 4 种 3′-双脱氧核苷三磷酸（ddNTP）代替部分脱氧核苷三磷酸作为底物进行 DNA 合成反应。一旦双脱氧核苷三磷酸掺入到合成的 DNA 链时，由于核糖的 3′位碳原子上不含羟基，无法与下一个核苷酸反应形成磷酸二酯键，导致正在延伸的 DNA 终止。

用 4 种发出不同颜色荧光的荧光素分别标记 4 种 ddNTP，以一定的比例与 4 种无标记 dNTP 混合，在同一反应管中用单向引物进行 DNA 延伸反应，带荧光素标记的某一 3′-双脱氧核苷三磷酸在掺入 DNA 片段导致合成终止的同时，使该片段 3′端标上了这种特定的荧光素。同一反应管中大量的模板 DNA 经过 20~30 循环的单向延伸反应，最终会产生许多仅相差一个单核苷酸的不同长度的单链 DNA 片段混合物，每个 DNA 片段 3′末端的最后一个 ddNTP，决定了该片段发出的荧光颜色。每一管中混合存在的不同长度的单链反应产物可以通过凝胶电泳在同一个泳道有效分开。检测器的激光束在凝胶的底部附近检测并记录通过泳道的每一条带所标记的荧光颜色，计算机阅读这四种颜色后得到并存储核酸序列。

（六）核酸分子杂交法用于检测组织或细胞中的互补序列

当溶液中的 DNA 分子被加热至 100℃或处于高 pH（pH≥13）时，靠碱基互补配对形成的双链分子打开成两条单链。这一过程被称为 DNA 变性（DNA denaturation）。当将溶液降至 65℃以下，保持一定时间，变性后的 DNA 单链或任何两条碱基互补的 DNA 单链可以很容易地再形成双螺旋结构，这一过程叫复性（renaturation），也叫杂交（hybridization）。同样，核酸的分子杂交也可以发生在互补的 DNA 与 RNA，RNA 与 RNA 之间。将一条已知序列的单链核酸片段用放射性同位素或其他标记物标记作为探针(probe)，去检测、分辨互补的 RNA 或 DNA 序列，是目前分子生物学领域中最常用的基本技术之一。核酸探针可以是人工合成的寡核苷酸片段、克隆的基因组 DNA、cDNA 全长或片段，或 RNA。核酸分子杂交技术敏感性很高，甚至可以检测到细胞中一个分子的互补核酸序列，因此，既可以定性又可以定量。

细胞生物学研究中常用的核酸杂交技术有原位杂交、Southern 印迹杂交和 Northern 印迹杂交。

1. 原位杂交　原位杂交技术（in situ hybridization，ISH）是将细胞或组织切片固定于载玻片上，使细胞中 DNA 或 RNA 在保持原来位置条件下，与标记的核酸探针进行原位杂交反应，通过放射自显影检测和显微镜观察，可以对所用材料中被杂交的核酸分子进行定位、定量分析或观察基因表达（mRNA）的水平。通常以检测基因表达即组织细胞中 mRNA 含量的方法称为 RNA 原位杂交。RNA 原位杂交的主要步骤是：①制备带有放射性同位素或非放射性物质标记的 cDNA 或 RNA 分子探针。常用于标记的放射性同位素有 ^{32}P、^{33}P、^{3}H 和 ^{35}S，非放射性物质如地高辛、生物素、荧光素和酶等。②将探针与组织或细胞在一定条件下共同孵育，使探针与组织细胞中待测的互补核酸单链结合(发生分子杂交)。③利用放射自显影或免疫细胞化学技术显示探针，从而获得mRNA 表达的组织细胞和水平

高低。

2. Southern 印迹杂交　Southern 印迹杂交（Southern blot）技术是检测基因组中特异 DNA 序列的方法。主要过程包括：①酶解与电泳，将被检测的 DNA 分子用一种或几种限制性内切酶消化成若干片段、并在琼脂糖凝胶电泳上分离；②印迹，经 DNA 变性处理后，利用虹吸作用将凝胶中待测的单链核酸序列片段转移到硝酸纤维素膜或尼龙膜等固相支持物上；③杂交，将探针与印迹有单链核酸序列片段的硝酸纤维素膜或尼龙膜在杂交液中孵育，使探针与待测的互补核酸单链结合；④放射自显影分析（对以非放射性物质标记的探针，则选用相应的酶显色处理），将 X-胶片置于杂交后的膜上，-70℃低温曝光适当时间后显影分析。Southern 印迹杂交主要用于 DNA 重组子的鉴定、基因敲除与转基因动物的鉴定、基因突变和缺失分析等。

3. Northern 印迹杂交　Northern 印迹杂交（Northern blot）技术是检测组织或细胞中特异性 mRNA 的方法。首先从组织或细胞中提取总 RNA 或 mRNA，在琼脂糖凝胶电泳之前需要对 RNA 样品进行变性处理，以破坏 RNA 分子中的局部双螺旋结构，使整个 RNA 分子呈单链（便于分子杂交）。常用变性剂为甲醛或戊二醛。Northern 印迹杂交的后续实验操作过程与 Southern 印迹杂交相同，依次经过电泳分离、印迹、杂交和放射自显影分析等步骤。Northern 印迹杂交主要用于检测组织或细胞中的基因表达。

（七）向细胞内导入分子的方法

为研究细胞的各种生命现象，常常需要将一些无法自由透过细胞膜的分子如前面所述水母发光蛋白质、荧光标记蛋白质及其他一些能对细胞的生命活动有影响的分子导入到细胞内。用玻璃微量吸管直接进行微量注射是一个常用方法，但需一个一个处理细胞，一次能够处理的细胞有限。电休克法可以使细胞膜的局部构造破坏，出现一些大孔，大小分子都可经这些孔进入细胞，根据电休克时电压的强度，数分钟至数小时后膜孔可自行封闭。大分子向细胞内导入的另一方法是用人造生物膜将大分子包入，形成封闭的脂质体与细胞膜融合后进入细胞（图 3-16）。现代分子生物学技术中，常常将外源基因导入哺乳细胞当中进行表达，所采取的方法除上述三种外，还可以选择磷酸钙转染法与二乙胺乙基葡聚糖（DEAE-dextran）转染法。磷酸钙可以与 DNA 形成 DNA-磷酸钙沉淀物，黏附于培养的哺乳动物单层细胞表面，进而被细胞所捕获。二乙胺乙基葡聚糖是一种高分子量的多聚阴离子试剂，能促进哺乳动物细胞捕获外源 DNA（图 3-16）。

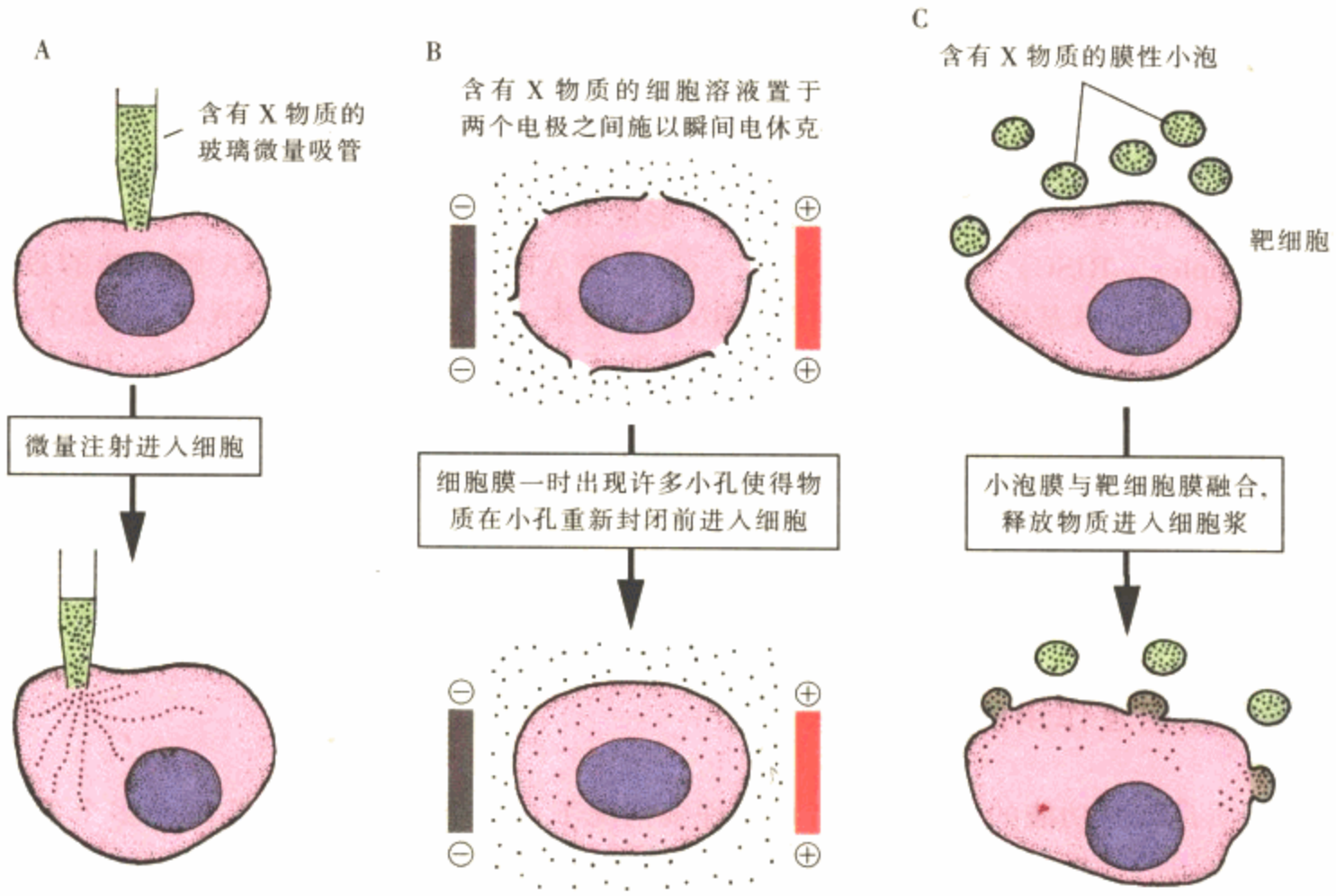
（八）外源基因产物可以在原核及真核细胞中表达

20 世纪 80 年代中期以前，只有那些在细胞内含量丰富的蛋白质才能够通过一系列复杂的方法分离纯化。用数百克细胞去纯化一个占细胞内蛋白质总量 1%的单一蛋白质时，若方法得当，可得到约 0.1g 的纯化蛋白质。这个量可以同时满足氨基酸序列分析、生物化学活性分析、制作抗体等需要。但大部分细胞内的蛋白质包括许多具有重要功能的蛋白质含量很低，难以用上述分离纯化的方法获得甚至几毫克的蛋白质。DNA 克隆和基因工程方法的建立对生物学的最重要的贡献之一就是使按计划、可以近乎无限量地生产细胞内的蛋白质成为可能（图 3-17）。

外源性基因可以与表达载体连接后在不同的宿主细胞中表达，包括大肠杆菌、枯草杆菌、酵母、植物细胞、昆虫细胞、哺乳动物细胞以至整体生物。对不同的表达系统，需要构建不同的表达载体（expression vector）。这些表达载体是通过基因工程的方法精心制造的质粒或病毒，能够在特定的宿主细胞内复制、增殖并表达目的蛋白质。

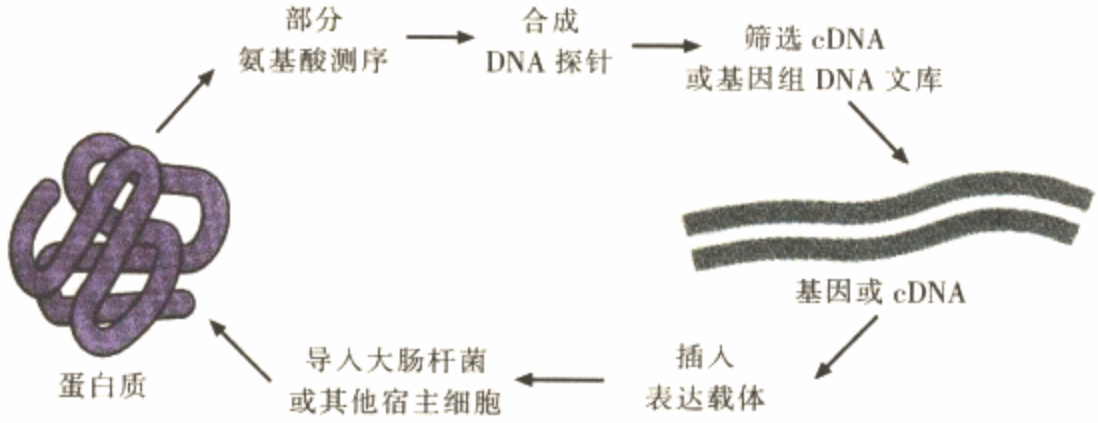
将带有外源性基因的克隆载体或表达载体导入原核细胞的过程叫转化（transformation），导入真核细胞的过程叫转染（transfection）。

20 世纪 80 年代中期以来，基因克隆的速度大大加快，基因表达产物的功能研究越发



●图 3-16　膜非透过性物质向细胞内导入的常用方法

A. 直接注入　B. 强力电休克使细胞膜瞬时出现许多小孔，物质得以进入　C. 膜性小泡包裹的物质经与细胞融合进入



●图 3-17　蛋白质-基因-蛋白质

少量纯化蛋白质可以通过测序得到部分氨基酸序列，据此可得到核酸序列信息而从 DNA 文库中克隆相应的基因。一旦基因被克隆，它的编码蛋白质的序列可以被插入一个表达载体在原核细胞或真核细胞产生大量的蛋白质

显得重要。外源性基因的表达是研究和探索基因功能、基因表达调控机制以及所编码蛋白质的结构与功能的重要方法，也是目前制备和生产新型蛋白质药物、抗体诊断试剂必不可少的手段。

二、RNA 干扰技术

为确定基因的功能，常需要对特定基因进行功能丧失或突变的操作。除通过复杂的基因敲除（knock out）方法产生突变个体之外，近年建立的 RNA 干扰（RNA interference，

RNAi）技术可比较简便地在低等生物（如线虫）或哺乳动物细胞水平对特定基因进行功能丧失或降低的操作。

RNAi 的基本原理：一定数量的外源性双链 RNA（dsRNA）进入细胞后，被类似于核糖核酸酶Ⅲ的 Dicer 酶切割成短的 21~23bp 的双链小干扰 RNA（small interferencing RNA，siRNA），siRNA 与解旋酶和其他因子结合，形成 RNA 诱导沉默复合物（RNA-induced silencing complex，RISC）。激活 RISC 需要一个依赖 ATP 的将小分子 RNA 解双链的过程。激活的 RISC 通过碱基配对定位到同源 mRNA 转录本上，并在距离 siRNA 3′端 12 个碱基的位置切割 mRNA。尽管切割的确切机制尚不明了，但每个 RISC 都包含一个 siRNA 和一个不同于 Dicer 的 RNA 酶。因此，siRNA 能够以序列同源互补的 mRNA 为靶点，通过促使特定基因的 mRNA 降解来高效、特异地阻断体内特定基因表达，诱发细胞呈现出特定基因表达降低（knock down）表型。

RNAi 技术操作简便，主要步骤是：首先人工化学合成或酶促合成 RNA 双链，然后通过脂质体包裹等技术将其转染到体外培养的哺乳动物细胞，主要用于基因功能研究。

三、蛋白质相互作用的研究技术

蛋白质是细胞功能的主要执行者。在许多情况下，一个细胞功能的实现是多个蛋白质分子相互作用的结果。细胞的生命活动，如细胞的信号转导、基因转录、蛋白转运、蛋白质修饰和降解等，都依赖于蛋白质之间的相互作用。研究蛋白质相互作用是理解细胞生命过程的关键。实验室中常用的蛋白质相互作用研究技术包括免疫沉淀、酵母双杂交等方法。

（一）免疫沉淀可验证蛋白-蛋白的相互作用

免疫沉淀（immuno-precipitation，IP）的主要过程是：首先用耦联在凝胶颗粒或磁珠上的目的蛋白的抗体将细胞匀浆或裂解液中的目的蛋白沉淀出来，在此过程中能够与目的蛋白发生相互作用的蛋白会被同时沉淀下来，然后用 SDS-PAGE、免疫印迹或生物质谱对沉淀出来的蛋白进行鉴定。免疫沉淀方法简便易行，是实验室最常用的方法，但是它属于体外（*in vitro*）实验方法，不能给出细胞内蛋白相互作用的动态结果，同时细胞内本来没有相互作用的蛋白质在破碎细胞时可能发生凝聚，因此免疫共沉淀还存在假阳性的问题。

（二）酵母双杂交用于筛选存在相互作用的蛋白质

酵母双杂交（yeast two-hybridization）的基本原理是：将目的蛋白与报告基因的 DNA 结合结构域构建成融合蛋白（目的蛋白通常称作诱饵 [bait]），将被筛选的蛋白与报告基因的转录激活结构域构建成融合蛋白（被筛选的蛋白通常称作俘获物 [prey]），如果目的蛋白和筛选的蛋白在酵母细胞中存在相互作用，则报告基因就会在酵母中进行表达，然后从阳性酵母菌落中分离出阳性蛋白的质粒就可以确定阳性蛋白的编码序列。酵母双杂交能快速检测蛋白相互作用，包括相应的结构域，并找到相应的编码基因，是一种被广泛采用的，在体内（*in vivo*）条件下研究蛋白质相互作用的方法。但是酵母双杂交只能说明两个蛋白质之间有相互作用的结构基础，并不表示这两个蛋白质在细胞内一定会相遇或这种相互作用在活细胞确实存在，因此酵母双杂交确定的实验结果通常需要用免疫共沉淀进行验证。另外，酵母双杂交只是个筛选系统，并不能直接将蛋白质相互作用与特定的细胞功能联系起来。

（三）噬菌体展示用另一种方式筛选存在相互作用的蛋白

噬菌体展示（phage display）是一种体外筛选蛋白与蛋白相互作用的技术，其基本原理是：将被筛选蛋白与噬菌体的衣壳蛋白构建成融合蛋白，使被筛选蛋白在噬菌体的表面进行表达；然后将目的蛋白固定在平板或小珠上，与展示不同筛选蛋白的噬菌体文库进行

孵育；孵育后洗去未结合噬菌体，然后分离特异性结合的噬菌体；分离出的噬菌体经体内扩增，再重复上述结合分离过程，使那些能展示与目的蛋白发生最特异结合的筛选蛋白的噬菌体得到逐步的富集，一般需经过 3 轮筛选/扩增循环，最后经过 DNA 测序鉴定所得噬菌体中筛选蛋白的编码基因。与其他技术相比，噬菌体展示技术的主要优点是容易对库容量较大的文库（多样性大于 10^9）进行筛选。

四、生物芯片技术

生物芯片（biochip）是 20 世纪 90 年代初期发展起来的一门由生物学、微电子学、物理学、化学和计算机科学等多学科交叉融合而成的高新技术。主要包括基因芯片和蛋白质芯片。

基因芯片（gene chip）技术是一种特殊类型的核酸杂交技术，其特点是，用于杂交的探针被固定在固相支持物（如玻璃片、硅片、硝酸纤维素膜）上，在每个支持物表面固定有大量（通常每平方厘米高于 400）的特定基因片段或寡核苷酸探针，这些探针有规律地排列成二维 DNA 阵列，故又称为 DNA 微阵列芯片（DNA microarray）。基因芯片与带有荧光标记样品 DNA 分子按碱基配对原理进行杂交，通过检测杂交的荧光强度就可获取样品分子的数量和序列信息。

基因芯片主要技术流程是：芯片的设计与制备，靶基因的标记，芯片杂交，杂交信号检测。芯片的制备主要是应用 DNA 点样仪将化学合成的寡核苷酸探针或 PCR 扩增的特异性基因片断点在经特殊处理的固相支持物表面。靶基因的标记通常采用荧光标记法，即在由 mRNA 反转录成 cDNA 时，应用荧光素标记其中一种核苷酸，这样便能合成带有荧光素标记的 cDNA。例如要检测实验组和对照组中的基因表达变化，如果实验组以红色荧光素标记，则对照组要以绿色荧光素标记。基因芯片与靶基因的杂交和一般的分子杂交过程基本相同，通常是将自等量总 RNA 或 mRNA 反转录成的经荧光素标记的实验组和对照组 cDNA 与一个芯片同时杂交。荧光观察结合计算机进行，如果芯片上的荧光点为黄色，则说明该基因在实验组和对照组中均有表达，并且表达量相同；若荧光点为红色则表明实验组中该基因高表达，荧光点为绿色表明对照组中该基因高表达。

基因芯片技术同时将大量探针固定于支持物上，可对样品中数以千计的核酸序列进行一次性的快速检测和分析，常用于组织细胞的基因表达谱测定、基因多态性与基因突变分析等方面。在基因功能研究中，基因芯片技术常用于筛选候选基因。

蛋白质芯片（protein chip）技术是指将大量蛋白质或多肽微固化于固相支持物表面，通过蛋白质-蛋白质间的相互作用（如抗原抗体反应、受体配体识别等），对样品中靶蛋白分子进行高通量检测的一种技术。蛋白质芯片的工作原理与基因芯片类似，也多是把荧光标记的待检样品与芯片上的蛋白质探针反应，洗脱未反应成分后检测特异的反应信号。

五、蛋白质组学研究技术

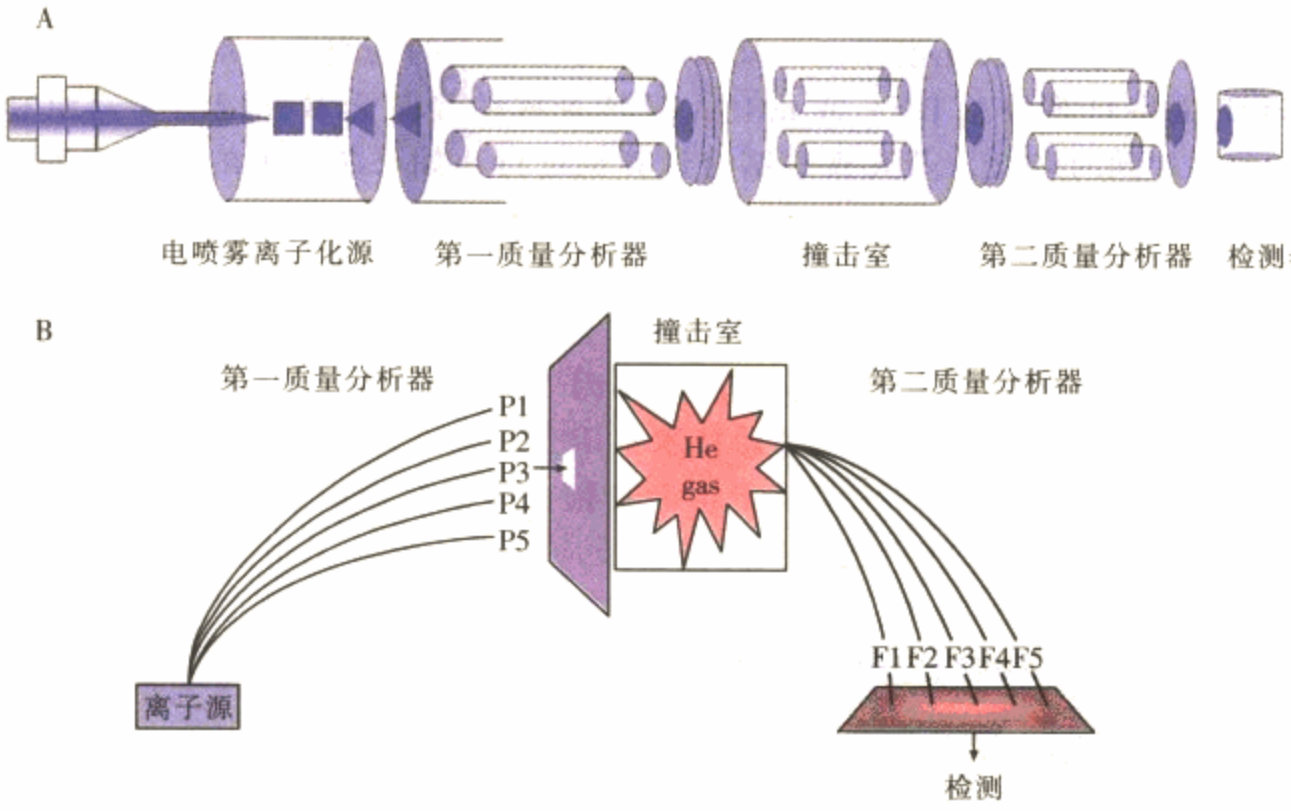
蛋白质组（proteome）是指在特定时空条件下某种细胞、组织或器官所含有的全部蛋白质。与此相对应蛋白质组学（proteomics）是以特定时空条件下某种细胞、组织或器官所含有的全部蛋白质的存在及其活动方式为研究对象的学科。目前蛋白质组学研究技术已成为确定基因功能的有效手段，是基因组学研究进入功能基因组时代的主要标志，是功能基因组时代生命科学研究的核心内容。其中，亚细胞器蛋白质组和器官蛋白质组研究日益成为蛋白质组学研究领域的热点。

蛋白质组学最初应用蛋白质双向电泳和质谱技术研究不同组织细胞中蛋白表达谱，是

蛋白质组学研究的基本技术，在此简要介绍。

来源于细胞或亚细胞结构的蛋白质样品在双向电泳中，先在第一向的高压电场下进行等电聚焦（IEF），然后再进行第二向的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。目前等电聚焦电泳采用固相 pH 梯度（IPG）胶条，避免了因载体两性电解质引起的聚焦时间延长、pH 梯度不稳定、阴极漂移等现象，其分辨率达已到 1 万多个蛋白质点，但对过于偏酸或偏碱、高分子量、微量蛋白质及难溶性蛋白质的分辨仍感困难。由于双向凝胶电泳对批量蛋白质可实现一次性分离，具有高灵敏度和高分辨率、便于计算机进行图像分析处理、可以很好地与质谱分析等鉴定方法匹配的优点，因而成为目前分离蛋白质组分的核心技术。

基于双向凝胶电泳的蛋白质组研究会产生大量数据，传统的微量蛋白质测序、氨基酸组成分析等蛋白质鉴定方法费时、费力、不易实现高通量分析。因此一种新的蛋白质鉴定技术——质谱法（mass spectrometry）受到了人们的重视和应用，其基本原理是样品分子离子化后，根据离子间质荷比（m/z）的差异来分离并确定样品的分子质量。目前用于蛋白质鉴定的质谱主要有两种：电喷雾电离质谱（electrospray ionization mass spectrometry，ESI-MS）和基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱（matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight，MALDI-TOF-MS）。蛋白质的质谱测序通常借助串联质谱（tandem mass spectrometry，MS/MS），即质谱联用技术，测定肽片段的序列结构。串联质谱将每个酶解短肽经第一级质谱或色谱分离进入撞击室，与氮气或氦气碰撞，沿着碳骨架断成不同长度的寡肽；第二级质谱测定由第一级质谱产生的寡肽的分子质量，一系列寡肽的分子质量差异对照各种氨基酸残基的分子质量，如此对号入座即可解读出肽段的氨基酸序列(图 3-18)。串联质谱在测定氨基酸序列方面具有灵敏度高、耗时短、样品不需纯化的特点。



●图 3-18　串联质谱测定多肽氨基酸序列

A. 串联质谱仪结构　B. 肽段在串联质谱中的运动过程　C. 肽段断裂位点

第六节　生物大分子的结构测定

生物大分子的结构与功能有着密不可分的关系。特别是对于种类繁多、结构复杂的蛋白质三维构造的分析，是掌握生物大分子功能，理解生命现象的重要手段。

一、核磁共振技术

核磁共振光谱仪（nuclear magnetic resonance spectroscopy，NMR）多年来已广泛用于小分子结构的分析。最近，NMR 开始用于研究蛋白质或蛋白质结构域（domain），测定蛋白质与配体的相互作用，提供蛋白质分子的动力学信息。与 X-射线衍射技术不同，NMR 不需结晶蛋白质样品，仅需将少量浓缩蛋白质溶液置于强磁场中即可测定。

某些原子核，特别是氢原子核，具有磁矩（magnetic moment）。它们像一个磁铁棒一样，在强磁场中成一线排列，称为自旋（spin）。当受到特定范围的电磁辐射时，原子核自旋方向改变，处于激发状态。当激发状态下的氢原子核恢复原状态时，释放出射频辐射。这种射频辐射可以被检测到，并以波谱的形式显示。释放出的辐射的性质取决于每个氢原子核所处的环境，而当一个核被激发时，会影响相邻其他核对辐射的吸收与释放。二维 NMR 技术可以区分不同氨基酸残基的氢原子核发出的辐射信号，从而可以检测到那些互相接近到能够发生相互作用的氢原子核所产生的辐射信号的细微漂移，漂移的大小揭示一对氢原子相互作用的距离。用这种方式，NMR 可以提供蛋白质分子内两个部分间的距离，再结合蛋白质的氨基酸序列，理论上用计算机构建蛋白质的三维结构是可能的。

由于技术上的原因，NMR 一直限于检测小于 20kD 的蛋白质，随着蛋白质分子量的增加，分辨率下降。但最近技术上的进步，使得 100kD 的蛋白质分析也成为可能，从而使 NMR 技术为大部分蛋白质检测所用。当目标蛋白质如一些膜蛋白质难以结晶时，NMR 技术尤显有用。因为研究是在溶液中进行，可以方便地监测到蛋白质结构的变化，比如自身折叠或与底物结合时发生的变化。NMR 技术也用来测定 RNA 分子的三维结构和糖蛋白中复杂的糖侧链的结构特点。

二、X-射线衍射技术

X-射线是波长很短的电磁射线，因此分辨率很高。但与可见光或电子束不同的是，穿过标本的 X-射线无法聚焦成像，只能用 X-射线衍射（X-ray diffraction）效应间接推断被检物体的微细结构。

单个物体比如单个分子受到波长比它小的电磁射线照射，物体会散射一部分射线，散射的射线实际上是由物体的不同部位发出的射线的光波重叠、干涉而成。在离物体一定距离处放置一屏幕可以记录下物体向各方向散射的射线量，即 X-射线衍射图（diffraction pattern）。物体的构造决定衍射图的式样，反之，从完整的衍射图可以计算出原物体的构造。但实际问题是，单个分子的衍射图太弱，效果不稳定，难以达到目的。当把许多同一分子制成晶体产生按同一方向有规律的晶格排列时，受到照射散发的射线的总量将会增加，每一分子产生的散射都会与另一分子产生的散射发生干涉。根据晶格排列的间距，仅在某些方向由于干涉而增强，产生亮点，使结晶排列的衍射图由各种不同强度的亮点不连续集结而成。亮点的强度取决于晶格排列物体的内部构造，即散射特性，亮点的位置取决于晶格排列物体的排列方式。因可获得大量正确且相同的信息，故可从结晶体完整的 X-射线衍

射图计算出物质的微细结构。

生物学上 X-射线衍射技术用来分析生物大、小分子的内部结构，如蛋白质、DNA 及 RNA 等。用衍射图分析分子的内部结构，所用射线的波长必须短于分子内原子间的距离。X-射线波长约为 0.1nm，等于氢原子的直径，很适合研究分子中的原子的排列方式，高分辨率的电镜也无法做到这一点。X-射线的另一优点是具有比电子更强的穿透力，可以分析较厚的样品。因为不需要真空，可以检测含水分的标本，从而可以避免在样品制作过程中产生失真。

使用分子整齐排列的大的蛋白质晶体，是高分辨地研究蛋白质分子结构的必备条件。X-射线穿过结晶体时，主要被样品中的电子所散射，具有许多电子的大原子比小原子散射 X-射线要多。因此，C、N、O、P 等原子比 H 原子要容易检测，同样，重的金属原子如血红蛋白中的铁原子，产生一个 X-射线散射的强亮点。迄今为止，X-射线衍射技术仍是确定分子中原子详细排列状况的惟一方法。因此，对当前人们所关注的、结构功能复杂的蛋白质的研究，X-射线衍射技术有着不可替代的作用。在具有高性能 X-射线检测器及大型高速计算机的今天，制约 X-射线技术在研究生物大分子中的应用主要来自于高质量的晶体的获得。不仅需要大量高度纯化的大分子，还需摸索适当的结晶条件，这个纯化、结晶的过程有时要耗费几年的时间。用较好的晶体可以分辨 0.3nm 的蛋白质结构，这可以确定主要的多肽链的位置。若能得到高质量的晶体，分辨率可达 0.15nm，能够确认除氢以外的所有原子的详细位置。

小结

人类对细胞、细胞内部的结构、细胞成分的功能及其相互关系的了解程度主要取决于所使用的研究手段和方法。显微镜技术包括光学显微镜技术、电子显微镜技术和纳米显微镜技术，主要是在不同层次和水平对细胞及其成分进行形态学观察。

在体外成功地对细胞进行分离、在培养皿中培养并建立细胞系对于研究各种生物细胞的性质和功能具有重要作用。

离心方法是分离和提取细胞亚显微结构和大分子的重要手段之一；对蛋白质的分离主要依靠柱层析法，其中亲和层析效果最好；蛋白质电泳是检测目的蛋白质的去向，或对得到的纯化蛋白进行鉴定分析的传统而有效的手段。

细胞化学技术是一类将细胞形态观察和组分分析相结合的分析方法。酶细胞化学技术、免疫细胞化学技术和放射性自显影技术都是细胞生物学常用的方法和手段。而细胞内离子的实时检测和绿色荧光蛋白标记则是活细胞内分子示踪较常用的方法。

生命科学的研究进入了后基因组学时代或功能基因组学时代。基因扩增、克隆、检测、表达等技术已成为基因研究的常规方法。siRNA 对 mRNA 的有效调控显示了良好的研究与应用前景。生物芯片技术能广泛地应用于 DNA、RNA 与蛋白质的研究。蛋白质组学研究技术是诸多传统、现代研究技术的综合。

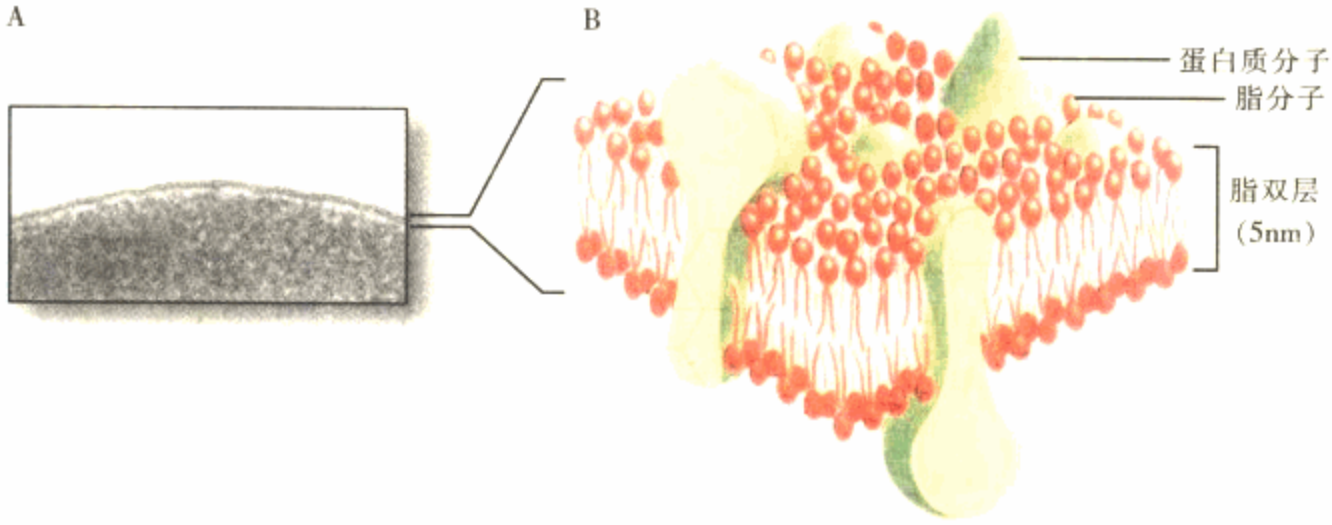
核磁共振光谱仪仅需将少量浓缩蛋白质溶液置于强磁场中即可进行蛋白质结构分析；X-射线衍射技术则能从蛋白质结晶衍射图中计算出精确的微细结构，目前仍是确定分子中原子详细排列状况的惟一方法。

（黄东阳）

第二篇　细胞的结构与功能

第四章　细胞膜与物质的跨膜运输

细胞膜（cell membrane）是包围在细胞质表面的一层薄膜，又称质膜（plasma membrane）。细胞膜将细胞中的生命物质与外界环境分隔开，维持细胞特有的内环境。在原始生命物质进化过程中，细胞膜的形成是关键的一步。没有细胞膜的形成，细胞形式的生命就不能存在。除质膜外，细胞内还有丰富的膜结构，形成了细胞内各种膜性细胞器，如内质网、高尔基复合体、溶酶体等，称为细胞的内膜系统。这些膜与质膜在化学组成、分子结构和功能活动方面具有很多共性，现在把质膜和细胞内膜系统总称为生物膜（biomembrane）。电子显微镜下，生物膜呈“两暗一明”的铁轨样形态，又被称为单位膜（unit membrane）（图 4-1）。



●图 4-1　细胞膜的结构

A. 单位膜的电镜照片　B. 细胞膜的三维结构

细胞膜不是一种机械屏障，它不仅为细胞的生命活动提供了稳定的内环境，还行使着物质转运、信号传递、细胞识别等多种复杂功能，并且与生命科学中的许多基本问题密切相关，如细胞的起源、增殖分化、细胞的识别、代谢、能量转换等。细胞膜的改变与神经退行性疾病、多种遗传病、恶性肿瘤等的发生相关。因此，正确认识细胞膜的结构与功能对揭示生命活动的奥秘具有重要意义。目前对生物膜的研究已深入到分子水平，对生物膜的化学组成和各组分的作用及不同组分间的相互作用有了新的认识。生物膜的研究也是当前细胞生物学和分子生物学的重要课题之一。本章主要介绍细胞膜的化学组成、分子结构、细胞膜特性及其主要功能等。由于细胞膜的许多特性和功能是各种生物膜所共有的，所以通过对细胞膜的了解，亦可对各种生物膜有一个基本认识。

第一节　细胞膜的化学组成与分子结构

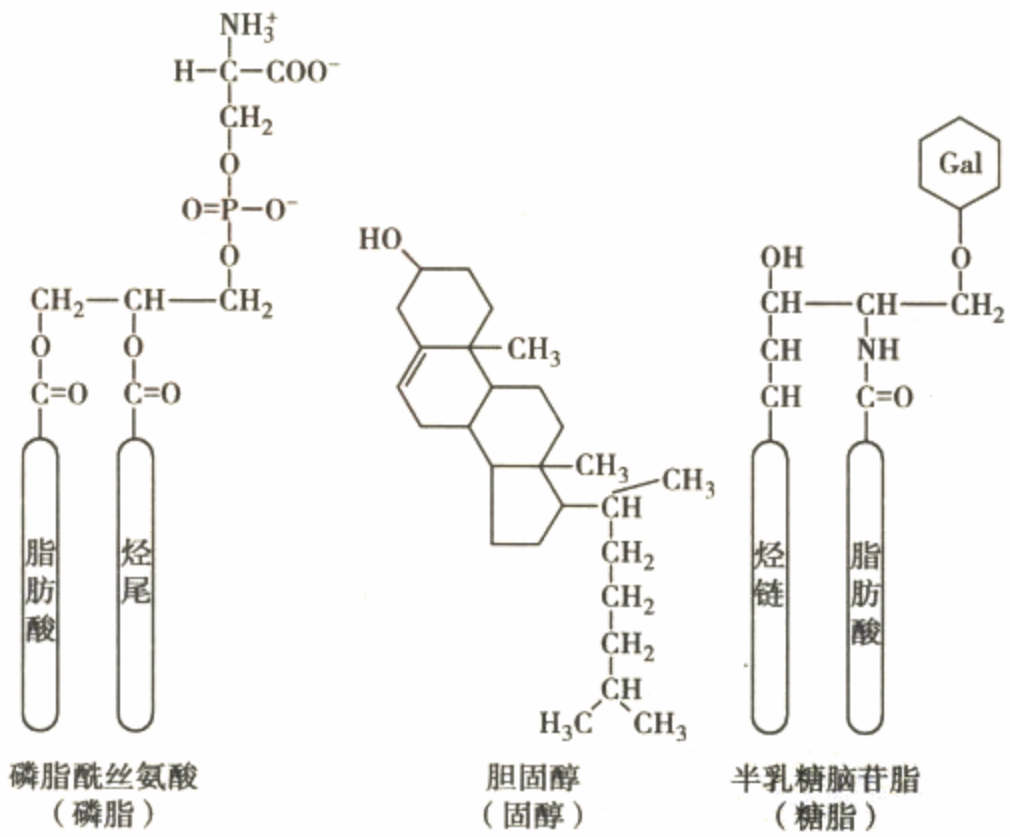
在各种不同类型的细胞中，细胞膜的化学组成基本相同，主要是由脂类、蛋白质和糖类组成。脂类常排列成双分子层，蛋白质通过非共价键与其结合，构成膜的主体，糖类多以复合物形式存在，通过共价键与膜的某些脂类或蛋白质组成糖脂或糖蛋白。此外，膜中还含有少量水、无机盐和金属离子等。

不同类型生物膜化学组成的各种成分的比例不同，这与其不同的结构和功能有密切关系。脂类和蛋白质所占的比例，变化范围从 1∶4 到 4∶1。一般说来，功能复杂的膜中蛋白质所占比例较大，如线粒体内膜中蛋白质占 75%，而髓鞘中蛋白质只占 18%，人红细胞膜中蛋白质和脂类的比例约为 1∶1。

一、细胞膜的化学组成

（一）膜脂构成细胞膜的基本骨架

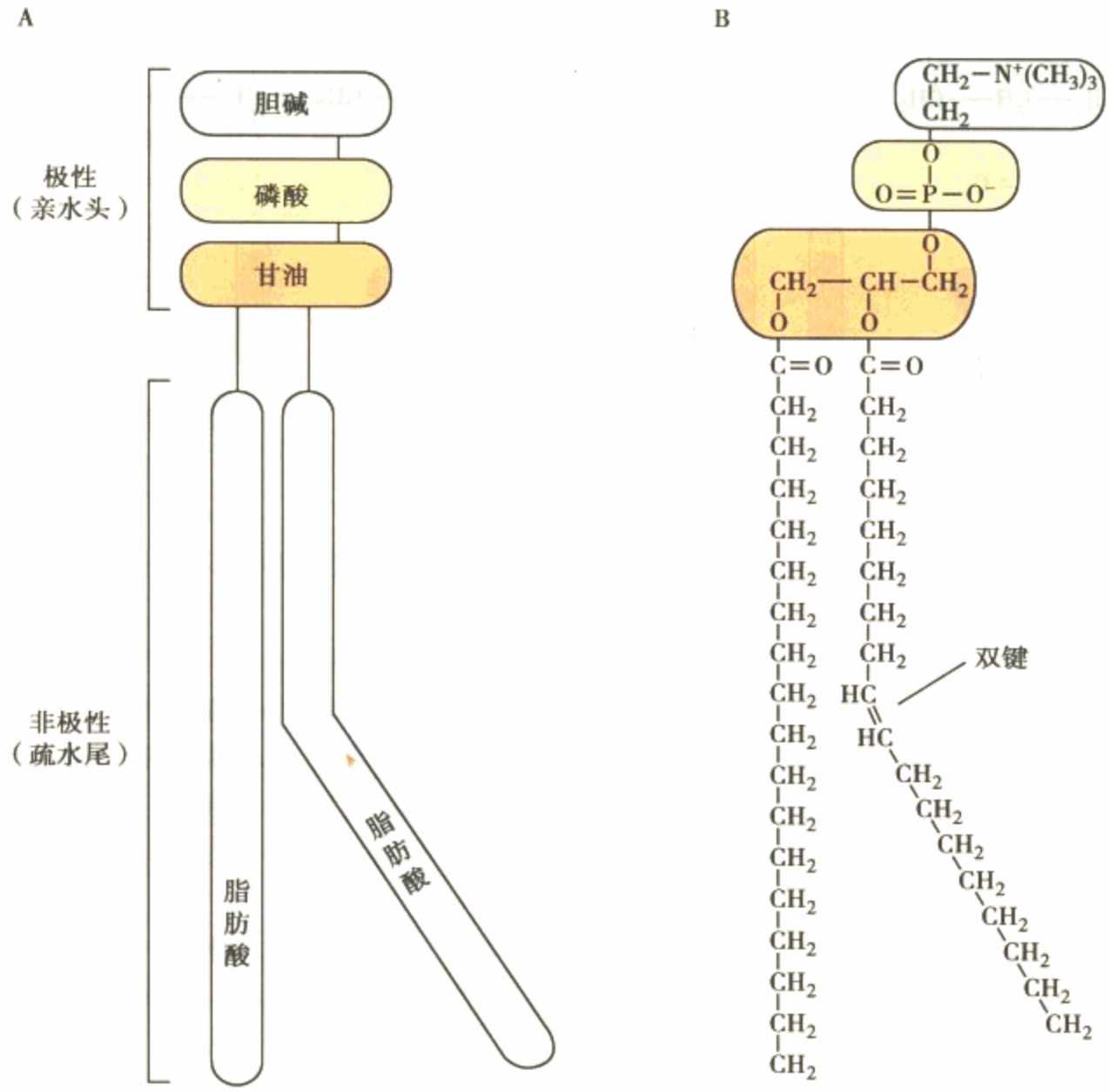
细胞膜上的脂类称为膜脂（membrane lipid），它是细胞膜的基本组成成分，约占膜成分的 50%，主要有三种类型：磷脂（phospholipid）、胆固醇（cholesterol）和糖脂（glycolipid），其中以磷脂含量为最多。膜脂构成细胞膜的基本骨架（图 4-2）。



●图 4-2　三种类型的膜脂分子

1. 磷脂构成膜脂的基本成分　磷脂约占整个膜脂的 50%以上。磷脂又可分为两类：甘油磷脂和鞘磷脂。甘油磷脂包括磷脂酰胆碱（卵磷脂）（phosphatidylcholine，PC）、磷脂酰乙醇胺（脑磷脂）（phosphatidylethanolamine，PE）、磷脂酰丝氨酸（phosphalidylserine，PS）和磷脂酰肌醇（phosphatidylinositol，PI）。这些磷脂分子在结构上有着共同的特征：以甘油为骨架，甘油分子的 1、2 位羟基分别与脂肪酸形成酯键，3 位羟基与磷酸形成酯键。磷酸基团分别与胆碱、乙醇胺、丝氨酸或肌醇结合，即形成上述 4 种甘油磷脂分子。这些亲水的小基团，与带负电的磷酸基团一起在分子的末端形成高度水溶性的结构域，被

称为亲水头。脂肪酸链长短不一，通常为 14~24 个碳原子组成，一条烃链不含双键（饱和的），另一烃链含有一个或几个顺式排列的双键（不饱和的），形成一个约 30°角的弯曲。脂肪酸链是疏水的，无极性，称疏水尾。由于磷脂分子具有亲水头和疏水尾，称之为双亲性分子（amphipathic molecule）或兼性分子（图 4-3）。



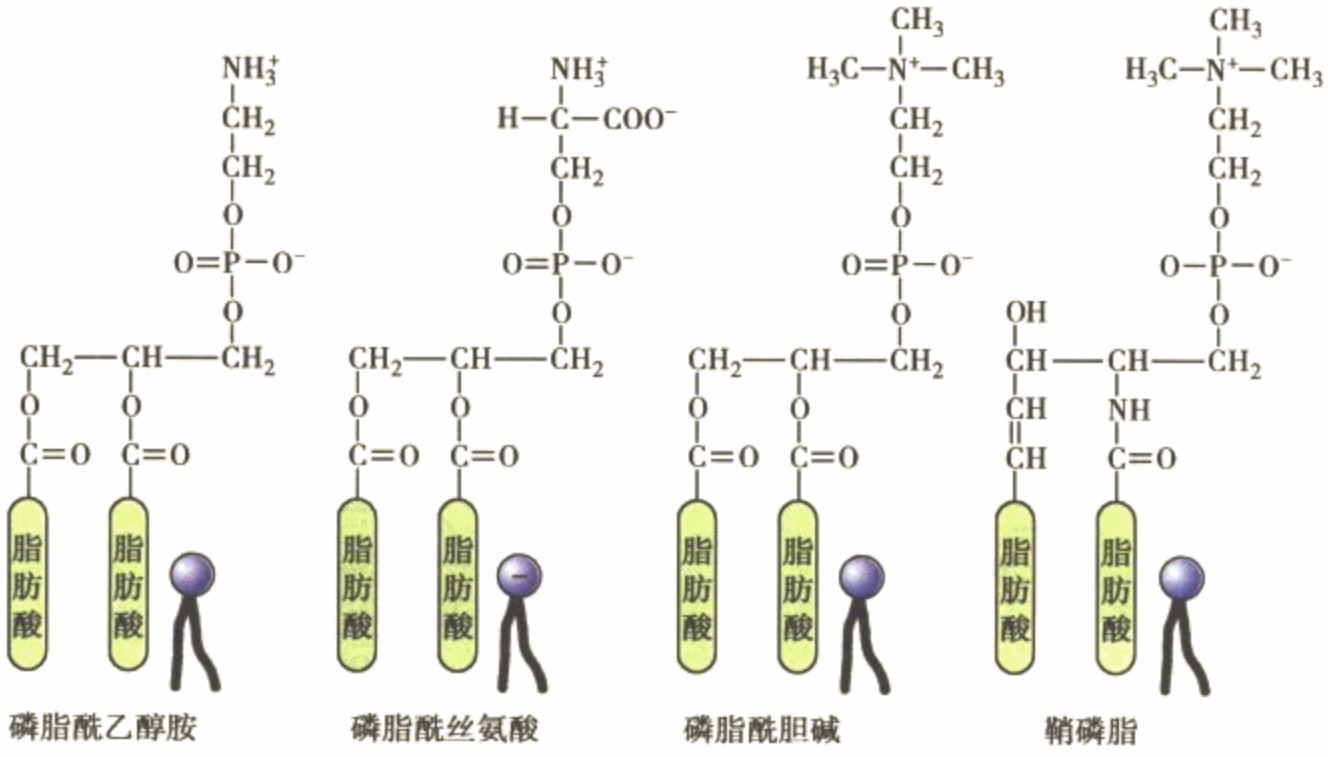
●图 4-3　磷脂酰胆碱化学结构

A. 磷脂酰胆碱分子示意图　B. 磷脂酰胆碱化学结构

鞘磷脂（sphingomyelin，SM）是细胞膜上惟一不以甘油为骨架的磷脂，在膜中含量较少，但在神经元细胞膜中含量较多。它以鞘氨醇代替甘油，长链的不饱和脂肪酸结合在鞘氨醇的氨基上（图 4-4）。

目前研究发现，鞘磷脂及其代谢产物神经酰胺、鞘氨醇及 1-磷酸鞘氨醇参与各种细胞活动，如细胞增殖、分化和凋亡等。神经酰胺是主要的第二信使，1-磷酸鞘氨醇在细胞外通过 G 蛋白耦联受体起作用，在细胞内与靶蛋白直接作用。

2. 胆固醇能够稳定膜和调节膜流动性　胆固醇是细胞膜中另一类重要的脂质，分子较小，在膜中散布在磷脂分子之间。动物细胞膜中胆固醇含量较高，有的膜内胆固醇与磷脂之比可达 1∶1；植物细胞质膜中胆固醇含量较少，约占膜脂的 2%。胆固醇也是双亲性分子，其极性头部为羟基团，靠近磷脂的极性头部。非极性疏水结构为固醇环和烃链。固醇环固定在磷脂分子邻近头部的烃链上，对磷脂的脂肪酸尾部的运动具有干扰作用；而疏水的烃链尾部埋在脂双层的中央（图 4-5）。胆固醇分子对调节膜的流动性和加强膜的稳定性具有重要作用。例如，有一种不能合成胆固醇分子的动物细胞突变株，如不在培养基中加

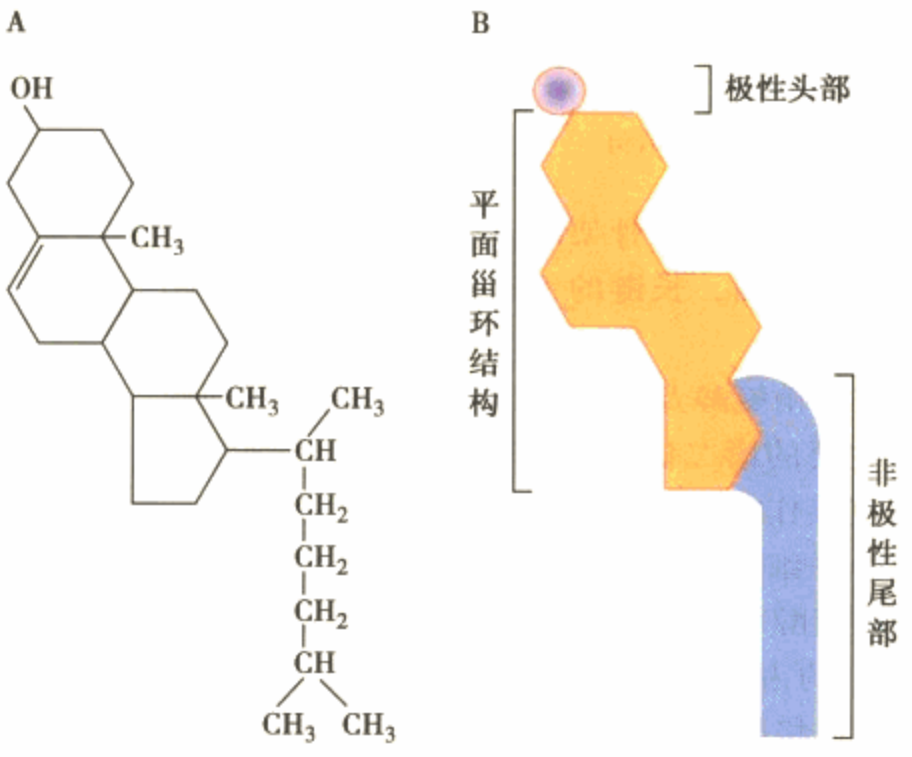


●图 4-4　质膜中的主要磷脂分子

入胆固醇，细胞会很快解体，只有在培养基中加入适量胆固醇并掺入到质膜中后，脂双层趋于稳定，细胞才能生存。

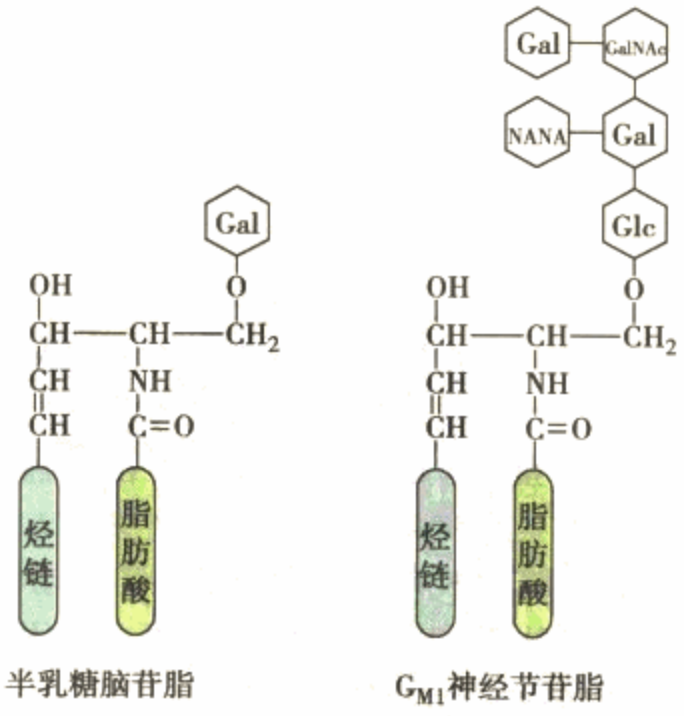
3. 糖脂主要位于质膜的非胞质面　糖脂由脂类和寡糖构成，其含量占膜脂总量的5%以下。糖脂普遍存在于原核和真核细胞质膜表面。在细菌和植物细胞，几乎所有的糖脂均是甘油磷脂的衍生物，一般为磷脂酰胆碱衍生的糖脂；动物细胞质膜的糖脂几乎都是鞘氨醇的衍生物，结构似鞘磷脂，称为鞘糖脂，特点是糖基取代了磷脂酰胆碱作为极性的头部，两条烃链为疏水的尾部（一条为脂肪酸链，另一条是鞘氨醇衍生的烃链）（图 4-6）。

目前已发现 40 余种糖脂，不同类型糖脂的主要区别在于其极性头部的不同。它由 1 个或几个糖残基构成。最简单的糖脂是脑苷脂，其极性头部仅有一个半乳糖或葡萄糖残



●图 4-5　胆固醇分子的化学结构

A. 胆固醇的化学结构　B. 胆固醇分子示意图



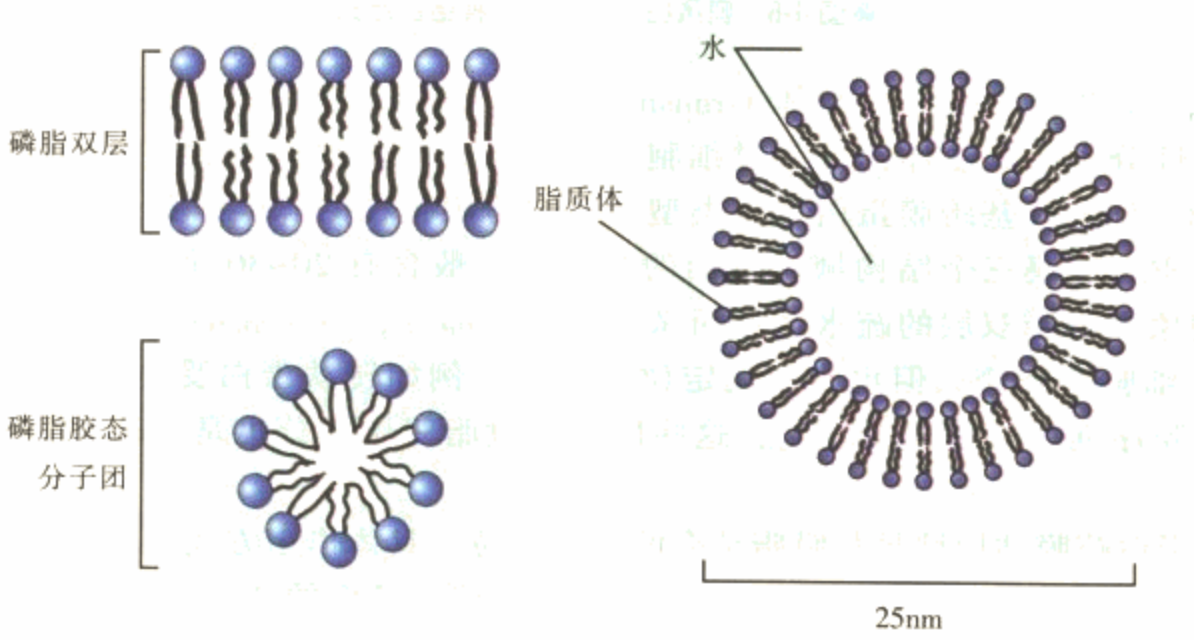
●图 4-6　糖脂的化学结构

Gal：半乳糖；Glc：葡萄糖；GalNAc：N-乙酰半乳糖胺；NANA：N-乙酰神经氨酸

基。较复杂的糖脂是神经节苷脂，其极性头部可含多达 7 个糖残基，除含有半乳糖和葡萄糖外，还含有数目不等的唾液酸。神经节苷脂在神经细胞的细胞膜中最为丰富，占总脂类的 5%~10%，但在其他类型细胞中含量很少。

所有细胞中，糖脂均位于质膜非胞质面，糖基暴露于细胞表面，其作用可能作为某些大分子的受体，参与细胞识别及信号转导。

膜脂都是两亲性分子，具有亲水的极性头部和疏水的非极性尾部。当这些两亲性分子被水环境包围时，它们就聚集起来，使疏水的尾部埋在里面，亲水的头部露在外面与水接触。这样可能存在两种形式：①形成球状的分子团（micelle），把尾部包藏在里面；②形成双分子层（bilayer），把疏水的尾部夹在头部的中间。为了避免双分子层两端疏水尾部与水接触，其游离端往往能自动闭合，形成自我封闭的脂质体（liposome）（图 4-7）。脂质体可用于膜功能的研究，如将膜蛋白插入脂质体中以研究其功能；脂质体也可以作为体内药物或 DNA 的运输载体，把药物或 DNA 连接至脂质体膜上或以高浓度的形式包含在腔内，用于基因转移或治疗某些遗传性代谢病。特别是脂质体技术与单克隆抗体等技术结合，可使药物更有效地作用于靶细胞，以减少对机体的损伤。



●图 4-7　磷脂分子团和脂质体结构

大多数磷脂和糖脂在水溶液中自动形成双分子层结构，而且这些脂质双分子层有自相融合形成封闭性腔室的倾向，不存在游离的边缘，避免疏水的尾部与水接触。同时脂双层受到损伤时可以自动再封闭上。脂双层除具有自组装的特点外，还有一些作为细胞膜理想结构的特点：①构成分隔两个水溶液环境的屏障。由于脂双层内为疏水的脂肪酸链，不允许水溶性分子、离子和大多数生物分子自由通过，保障了细胞内环境的稳定；②自然界中的脂双层是黏滞的二维流体，而非固体，脂类分子和蛋白质可以在膜内运动、侧向扩散，使细胞膜具有流动性。膜脂的组成能够决定细胞膜的物理状态，并影响特殊膜蛋白的活性，这与膜的许多重要功能有关。

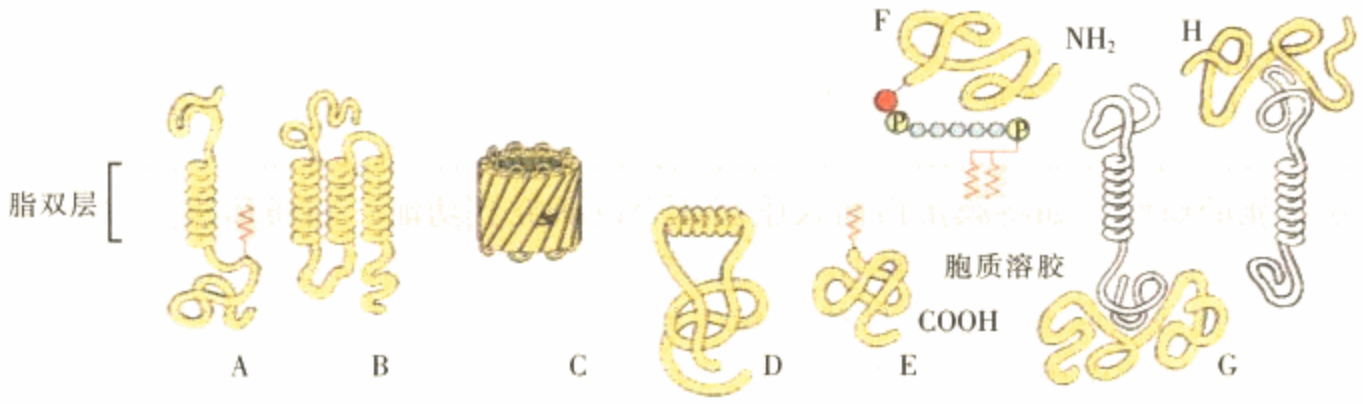
（二）膜蛋白执行细胞膜的多种重要功能

虽然细胞膜的基本结构是由脂双层组成，但细胞膜的许多重要功能却主要是由膜中存在的蛋白质完成。膜蛋白中有些是转运蛋白，转运特定的分子或离子进出细胞；有些是结合于质膜的各种酶，催化与其相关的代谢反应；有些是连接蛋白，连接相邻细胞，或连接细胞骨架及细胞外基质成分；有些是受体蛋白，接受周围环境中激素或其他化学物质信号，转导至细胞内引起相应的反应。

在不同细胞中膜蛋白（membrane protein）的含量及类型有很大差异。如在包围神经

细胞轴突的髓鞘中，膜蛋白的含量不到25%；而在担负能量转换功能的线粒体内膜中蛋白含量约占75%；一般的细胞膜中蛋白质含量介于两者之间，约占50%左右。由于脂类分子比蛋白质分子小，在蛋白质含量占50%的膜内，蛋白质与脂类分子数目比例约为1∶50。

根据膜蛋白与脂双层结合的不同方式，膜蛋白可分为三种基本类型：内在膜蛋白（intrinsic membrane protein）或整合膜蛋白（integral membrane protein）、外在膜蛋白（extrinsic membrane protein）和脂锚定蛋白（lipid anchored protein）（图4-8）。



●图4-8　膜蛋白在膜中的几种结合方式

1. 内在膜蛋白　又称跨膜蛋白（transmembrane protein），占膜蛋白总量的70%~80%。它也是两亲性分子。其主体部分穿过细胞膜脂双层，分为单次跨膜（图4-8A）、多次跨膜（图4-8B）和多亚基跨膜蛋白三种类型。单次跨膜蛋白的肽链只穿过脂双层一次，具有胞外、胞质和跨膜三个结构域。它们的跨膜域一般含有20~30个疏水性氨基酸残基，以α螺旋构象穿越脂双层的疏水区；而亲水的极性部分，位于膜的内外两侧，一般肽链的N端位于细胞膜外侧，但也有相反定位的例子（例如转铁蛋白受体）。多次跨膜蛋白含有多条跨膜序列（可多达14个），这些序列穿过脂双层部分也是由疏水性氨基酸残基构成。

内在膜蛋白跨膜结构域是与膜脂结合的主要部位，具体作用方式如下：

（1）跨膜结构域的疏水性氨基酸残基形成α-螺旋（长度约3nm），其外部疏水侧链通过范德华力与脂双层分子脂肪酸链（厚度约3.2nm）相互作用，这样就把蛋白质封闭在膜的脂“壁”中。这种α-螺旋可能是多数跨膜蛋白共同的结构特征。

（2）某些α-螺旋的外侧是非极性链，内侧是极性链，形成了特异性极性分子的跨膜通道。如人红细胞质膜上的带Ⅲ蛋白（Band Ⅲ），它介导Cl^-/HCO_3^-的跨膜运输。

大多数跨膜蛋白跨膜域都是α-螺旋构象，也有的跨膜蛋白以β-折叠片层构象穿膜。β-折叠片层多次穿过质膜，并围成筒状结构，称β筒（β barrel）。其中研究最清楚的是孔蛋白（porin），存在于真核细胞线粒体外膜和细菌质膜中，允许相对分子量小于10^4的小分子自由通过。

2. 外在膜蛋白　又称外周蛋白（peripheral protein），占膜蛋白总量的20%~30%，完全位于脂双层之外，分布在胞质侧或胞外侧，一般通过非共价键（如弱的静电作用）附着在脂类分子头部极性区或跨膜蛋白亲水区的一侧，间接与膜结合（图4-8G，H）。有时外周蛋白与跨膜蛋白难以截然区分，因为许多跨膜蛋白是由几条多肽链组成，其中一些穿越脂双层，另一些驻留在外周。研究较清楚的是位于质膜内表面（胞质面）的外周蛋白，它们在该处形成一个纤维网络，即膜“骨架”，给膜提供机械支持，并为整合蛋白提供锚定位点。例如，红细胞的血影蛋白和锚蛋白即为外周蛋白，它们在决定红细胞的双凹外形、抵抗其穿越毛细血管时的挤压力及维持红细胞膜的完整性方面具有重要作用。很多遗传性疾病（如溶血性贫血）表现为红细胞脆性及形态异常的特征，这涉及引起血影蛋白或锚蛋

白结构和功能改变的基因突变。细胞色素 C 也是一种典型的外周蛋白，它通过静电作用结合在线粒体内膜的外周。

外周蛋白为水溶性蛋白，它与膜的结合较弱，一般用一些温和的方法，如改变溶液的离子强度或 pH，即可将它们从膜上分离下来，而不需破坏膜的基本结构。

3. 脂锚定蛋白　又称脂连接蛋白（lipid-linked protein）。这类膜蛋白位于膜的两侧，很像外周蛋白，但与其不同的是脂锚定蛋白以共价键与脂双层内的脂分子结合。

脂锚定蛋白以两种方式通过共价键结合于脂类分子。一种位于质膜胞质一侧，直接通过与脂双层中的碳氢链形成共价键而被锚定在脂双层上。Src 和 Ras 即是通过这种方式被锚定在质膜的胞质面，这种锚定方式与细胞从正常状态向恶性状态转化有关（图 4-8E）。另一种方式是位于质膜外表面的蛋白质，通过与脂双层外层中磷脂酰肌醇分子相连的寡糖链共价结合而锚定到质膜上，所以又称为糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白（glycosylphosphatidylinositol linked protein，GPI）。这种连接主要是通过蛋白质的 C 端与寡糖链共价结合，从而间接同脂双层结合（图 4-8F）。膜蛋白的这种锚定形式与跨膜蛋白相比，在理论上有许多优点。由于它们在膜上的运动性增大，有利于结合更多的蛋白质，而且脂锚定蛋白具有更多的侧向运动能力，有利于和其他细胞或有生理功能的胞外分子更快地结合和反应。GPI-锚定蛋白分布极广，目前大约有 100 多种蛋白已被确定是 GPI-锚定蛋白，包括有多种水解酶、免疫球蛋白、细胞黏附分子、膜受体等。在信号转导中起重要作用的 G 蛋白就是脂锚定蛋白。

为了研究膜蛋白的结构与功能，必须首先将其从细胞膜上分离出来，纯化后进行功能研究。由于跨膜蛋白是双亲性分子，所以很难以水溶液的形式分离。要分离内在膜蛋白，必须使用能破坏疏水作用并能瓦解脂双层的试剂，一般常使用去垢剂。

十二烷基磺酸钠（SDS）为常用的离子型去垢剂，它是两亲性的脂质样分子，既有一个亲水区又有一个疏水区（烃链）。当用过量的去垢剂与膜混合时，去垢剂分子的疏水端与跨膜蛋白的跨膜疏水区结合，也与磷脂分子的疏水尾部结合，从而把跨膜蛋白与磷脂分开。由于 SDS 的极性端带电荷（离子型），可以形成蛋白质-去垢剂水溶性复合物溶于液体中，同时去垢剂也能溶解膜磷脂。SDS 对蛋白质的作用较强烈，能引起蛋白质变性，为获得有活性的膜蛋白时，可采用非离子去垢剂。

Triton X-100 是非离子去垢剂，也可使细胞膜崩解，但对蛋白质的作用比较温和，它不仅用于膜蛋白的分离与纯化，也用于去除细胞内膜系统，以便对细胞骨架和其他蛋白质进行研究。

（三）膜糖类覆盖细胞膜表面

细胞膜中含有一定量的糖类，由于种属和细胞类型不同，糖类约占质膜重量的 2%~10%。如红细胞膜中的糖类占膜总重量的 8%。膜糖类大多数以低聚糖或多聚糖链形式共价结合于膜蛋白上形成糖蛋白，或者以低聚糖链共价结合于膜脂上形成糖脂。质膜上所有的糖链都朝向细胞表面。组成低聚糖的单糖主要有半乳糖、甘露糖、岩藻糖、半乳糖胺、葡萄糖、葡萄糖胺和唾液酸等。由于组成寡糖的单糖的数量、种类、排列顺序以及有无分支等不同，低聚糖或多聚糖链出现了千变万化的组合形式。唾液酸残基常见于糖链的末端，真核细胞表面的净负电荷主要由它形成。

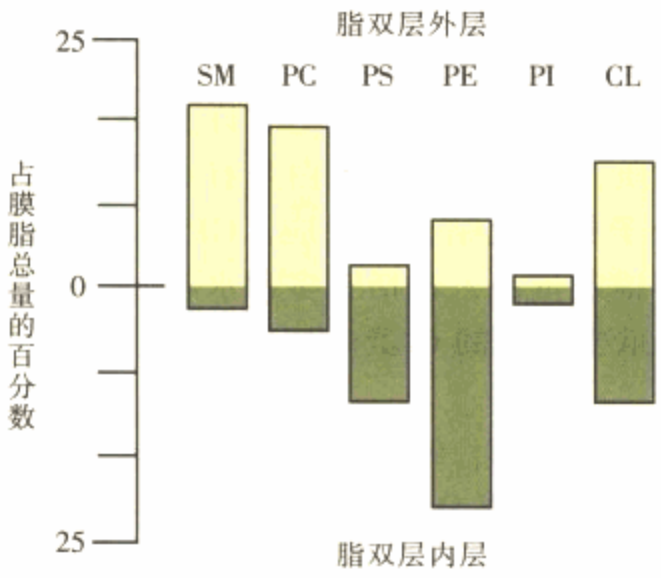
糖脂及糖蛋白中低聚糖侧链的功能还不清楚。位于某些跨膜蛋白上的低聚糖侧链可能有助于蛋白质在细胞膜上定位及固定，以防止其滑入细胞质或在脂双层中翻转。另外，细胞膜糖蛋白与糖脂上某些低聚糖结构的复杂性及其在细胞表面上所处的位置提示，这些由低聚糖侧链参与组成的糖蛋白和糖脂可能参与细胞与环境相互作用等多种生物学过程。

二、细胞膜的特性

细胞膜是由脂双分子层和以不同方式与其结合的蛋白质构成的生物大分子体系，它除具有包围细胞质，形成“屏障”作用以外，还执行物质运输、信号转导、细胞识别和能量转化等多种重要的功能。这和它的分子结构、组成特性有关。细胞膜的主要特性是膜的不对称性和流动性。

（一）膜的不对称性决定膜功能的方向性

膜的不对称性（membrane asymmetry）是指细胞膜中各种成分的分布是不均匀的，包括种类和数量上都有很大差异，这与细胞膜的功能有密切关系。



●图 4-9　人红细胞膜中几种膜脂的不对称分布

SM：鞘磷脂；PC：磷脂酰胆碱；PS：磷脂酰丝氨酸；PE：磷脂酰乙醇胺；PI：磷脂酰肌醇；CL：二磷脂酰甘油

1. 膜脂的不对称性　一系列实验分析了各种膜脂双层内层、外层的化学组成，发现膜脂在脂双层中的分布是不对称的。例如在红细胞膜脂双层中，外层鞘磷脂和磷脂酰胆碱含量较多，而在内层含磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸较多（图 4-9）。不同类型的细胞膜中各种脂类含量也不同。细胞膜中糖脂均位于脂双层非胞质面，不对称分布是绝对的，而大多数磷脂和胆固醇不对称分布是相对的，仅为含量比例上的差异。

膜脂不对称性还表现在不同膜性细胞器中脂类成分组成不同。质膜中一般富含鞘磷脂、磷脂酰胆碱和胆固醇等；核膜、内质网膜和线粒体外膜则富含磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇；而高尔基复合体膜的脂类组成介于内质网与质膜之间；线粒体内膜则富含心磷脂。膜脂组分分布的不对称性，与特定膜具有不同的功能有密切关系。

膜脂不对称性分布的生物学功能还不清楚。它可以使脂双层内、外两层流动性有所不同；也可能一些脂类结合了特定的膜蛋白，对保持膜蛋白在脂双层中的正确定位和极性有重要作用。

2. 膜蛋白的不对称性　膜蛋白分布是绝对不对称的，各种膜蛋白在质膜中都有一定的位置。如红细胞膜内侧面分布有血影蛋白，而外侧没有。放射性核素示踪法发现，酶和受体多位于质膜的外侧面，如 5′-核苷酸酶、磷酸酯酶、激素受体、生长因子受体等，而腺苷酸环化酶则位于质膜的内侧胞质面。膜中的外周蛋白主要附着在膜的内表面。用冷冻蚀刻技术得到细胞膜的两个剖面，可清楚地看到膜蛋白在脂双层内、外两层中的分布有明显差异。如红细胞膜的冷冻蚀刻标本显示，细胞质断裂面内蛋白颗粒为 2 800 个/μm^2，外断裂面内蛋白颗粒只有 1 400 个/μm^2。

跨膜蛋白穿越脂双层都有一定的方向性，这也造成其分布的不对称性。例如，红细胞膜上的血型糖蛋白肽链的 N 端伸向质膜外侧，C 端在质膜内侧胞质面；带 3 蛋白肽链的 N 端则在质膜内侧胞质面。膜蛋白的不对称性还表现在跨膜蛋白的两个亲水端，它们不仅长度不同，而且氨基酸的种类、顺序也都不同，有的在膜外侧有活性位点，有的在膜内侧有活性位点。

3. 膜糖的不对称性　如前所述，膜糖类的分布具有显著的不对称性。细胞膜糖脂、糖蛋白的寡糖侧链只分布于质膜外表面（非胞质面），而在内膜系统，寡糖侧链都分布于膜腔的内侧面（非胞质面）。

膜的不对称性还表现在脂双层侧向分布的不对称性，即在二维平面内膜组分的分布是

不均一的。在质膜中有一些功能性微区（结构域）称为“脂筏”（lipid rafts），这是一些富含鞘脂类和胆固醇的区域，其中聚集一些特定种类的膜蛋白，参与细胞的内吞、囊泡转运和信号转导等生理活动。脂筏周围则是富含不饱和磷脂的流动性较高的液态区。

另外，对于有极性的细胞，相邻细胞间的紧密连接将上皮细胞的质膜分成游离面和基底面两个不同的功能结构区，这两个区域存在很大差异，有着不同的脂类和蛋白质组分。如所有糖脂都分布在游离面上，而磷脂酰胆碱主要是分布在基底面上。

膜组分分布不对称性具有重要的生物学意义，膜脂、膜蛋白及膜糖分布的不对称性与膜功能的不对称性和方向性有密切关系。膜结构上的不对称性保证了膜功能的方向性，使膜两侧具有不同的功能，保证了生命活动的高度有序性。如红细胞质膜表面糖脂的寡糖链决定了 ABO 血型；许多激素的受体位于质膜的外侧，它们在将质膜接受的外部信号向细胞内传递的过程中起重要作用。

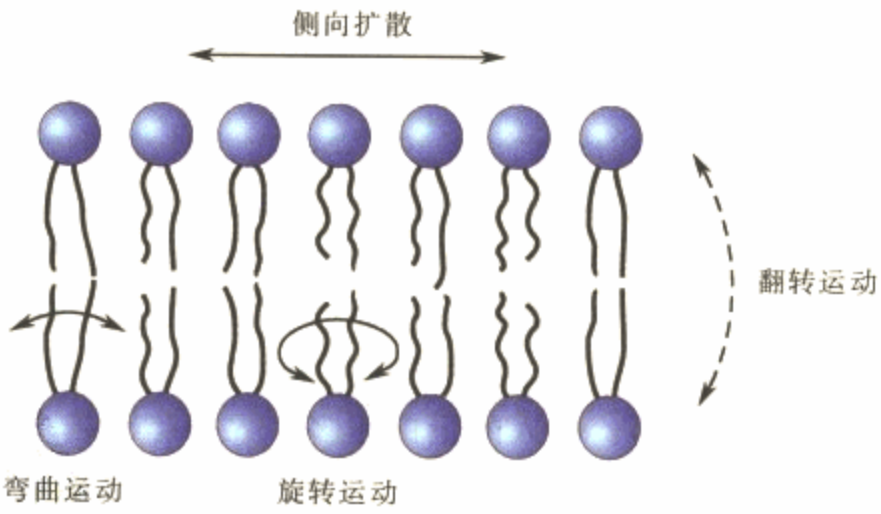
（二）膜的流动性是膜功能活动的保证

膜的流动性（fluidity）是细胞膜的基本特性之一，也是细胞进行生命活动的必需条件。膜是一个动态的结构，其流动性主要是指膜脂的流动性和膜蛋白的运动性。

1. 膜脂双分子层是二维流体　细胞内外的水环境使得膜脂分子不能自脂双层中逸出，但是膜脂和膜蛋白分子在脂双层的单层平面内可以前后左右运动和彼此之间交换位置，因此，膜可以看作是二维流体即具有液晶态结构。作为生物膜主体的脂质双分子层，它的组分既有固体所具有的分子排列的有序性，又具有液体的流动性。这种居于晶态和液态之间的状态，即两种特性兼有的液晶态（liquid-crystal state）是细胞膜极为重要的特性。

在生理条件下，膜大多呈液晶态。当温度下降到某一点时，它可以从流动的液晶态转变为晶态；温度上升时又可以熔融为液晶态。把这一临界温度称为膜的相变温度。温度的变化导致膜状态的改变称为“相变”。在相变温度以上，液晶态的膜处于流动状态，保证了各种膜蛋白也处于运动状态，它们协同完成生物膜的各项功能活动。细胞膜的各种重要功能活动都与其流动性密切相关。

2. 膜脂分子能进行多种运动　20 世纪 70 年代，对人工合成的脂双层膜的研究证明，膜脂的单个分子能在脂双层平面自由扩散。应用多种新技术如差示扫描量热术、磁共振、放射性核素标记等检测膜脂分子的运动，结果表明，在高于相变温度的条件下，膜脂分子具有以下几种运动方式（图 4-10）。



●图 4-10　膜脂分子的几种运动方式

（1）侧向扩散运动：侧向扩散是指在脂双层的单分子层内，脂类分子沿膜平面侧向与相邻分子快速交换位置。扩散速度快，1 秒钟内可扩散约 10^7 次，是膜脂分子主要的运动方式。处于液晶态的脂双层在 30℃时其脂类分子的侧向扩散系数 D_L 为 $1\times10^{-8}cm^2/s$，此数值说明一个脂类分子在 20s 内能迁移大约 10^4nm，大约为一个细胞直径这样的距离。这种运动始终保持脂类分子的排列方向，即亲水的头部基团朝向膜表面，疏水的尾部朝向膜的内部。

（2）翻转运动：是指膜脂分子从脂双层的一单层翻转至另一单层的运动。一般情况下这种运动很少发生。内质网膜上有一种翻转酶（flippases），它能促使某些新合成的磷脂分子从脂双层的胞质面翻转到非胞质面。这些酶在维持膜脂的不对称分布中起作用。

（3）旋转运动：是膜脂分子围绕与膜平面相垂直的轴的自旋运动。

（4）伸缩和振荡运动：脂肪酸链沿着与膜平面相垂直的长轴进行伸缩。由于磷脂分子的甘油骨架被固定在亲水端，因而极性基团运动最慢，甘油骨架次之，脂肪酸烃链的运动最快，显示出一种流动梯度。

（5）烃链的旋转异构运动：细胞膜脂类的脂肪酸烃链可以绕 C—C 自由旋转而产生旋转异构体，即反式（trans）构象和歪扭（gauche）构象。在低温条件下，烃链呈全反式构象，相对流动性较低；随着温度升高，歪扭构象逐渐增多，烃链流动性增高。烃链中各亚基（$—CH_2—$）之间处于动态的反式与歪扭构象转换中。因此，脂肪酸链内的旋转异构化运动是脂双层流动性的分子基础，也是膜流动性的主要因素。

3. 多种因素影响膜脂的流动性　膜脂的流动性对于膜的功能具有重要作用，它必须维持在一定范围内才能保证膜的正常生理功能。膜脂的流动性主要依赖于其本身的分子属性及组成成分，影响其流动性的主要因素如下：

（1）脂肪酸链的饱和程度：相变温度的高低和流动性的大小决定于脂类分子排列的紧密程度，饱和脂肪酸链呈直线形，排列较紧密；而不饱和脂肪酸链在双键处形成折屈，使之成为弯曲状，排列比较疏松，从而增加了膜的流动性。脂双分子层中含不饱和脂肪酸越多，相变温度越低，其流动性也越大。膜脂脂肪酸链不饱和程度主要通过代谢来调节，如当环境温度降低时，细胞通过一种去饱和酶（desaturases）的催化将单键去饱和形成双键，或通过磷脂酶和脂酰转移酶在不同磷脂分子间重组脂肪酸链以产生含两个不饱和脂肪酸链的磷脂分子。这是细胞适应环境温度变化而调节其流动性的主要途径。

（2）脂肪酸链的长短：脂肪酸链的长短与膜的流动性有关。脂肪酸链短的相变温度低，流动性大，这是因为脂肪酸链越短则尾端越不易发生相互作用。在相变温度以下，不易发生凝集而增加了流动性；长链则增加分子的有序性，使流动性降低。

（3）胆固醇的双重调节作用：动物细胞质膜含较多的胆固醇，对膜的流动性起重要的双重调节作用。当温度在相变温度以上时，由于胆固醇分子的固醇环与磷脂分子的烃链部分相结合限制了膜的流动性，起到稳定质膜的作用。当温度在相变温度以下时，由于胆固醇位于磷脂分子之间隔开磷脂分子，可有效地防止脂肪酸链相互凝聚，干扰晶态形成。动物细胞质膜中所含胆固醇的量可以有效地防止低温时膜流动性的突然降低。

（4）卵磷脂与鞘磷脂的比值：哺乳动物细胞中，卵磷脂和鞘磷脂的含量约占膜脂的 50%。其中卵磷脂的脂肪酸链不饱和程度高，相变温度较低；鞘磷脂则相反，其脂肪酸链饱和程度高，相变温度也高，且范围较宽（25~35℃）。在 37℃时，卵磷脂和鞘磷脂二者均呈流动状态，但鞘磷脂的黏度却比卵磷脂大 6 倍，因而鞘磷脂含量高则流动性降低。在细胞衰老过程中，细胞膜中卵磷脂与鞘磷脂的比值逐渐下降，其流动性也随之降低。

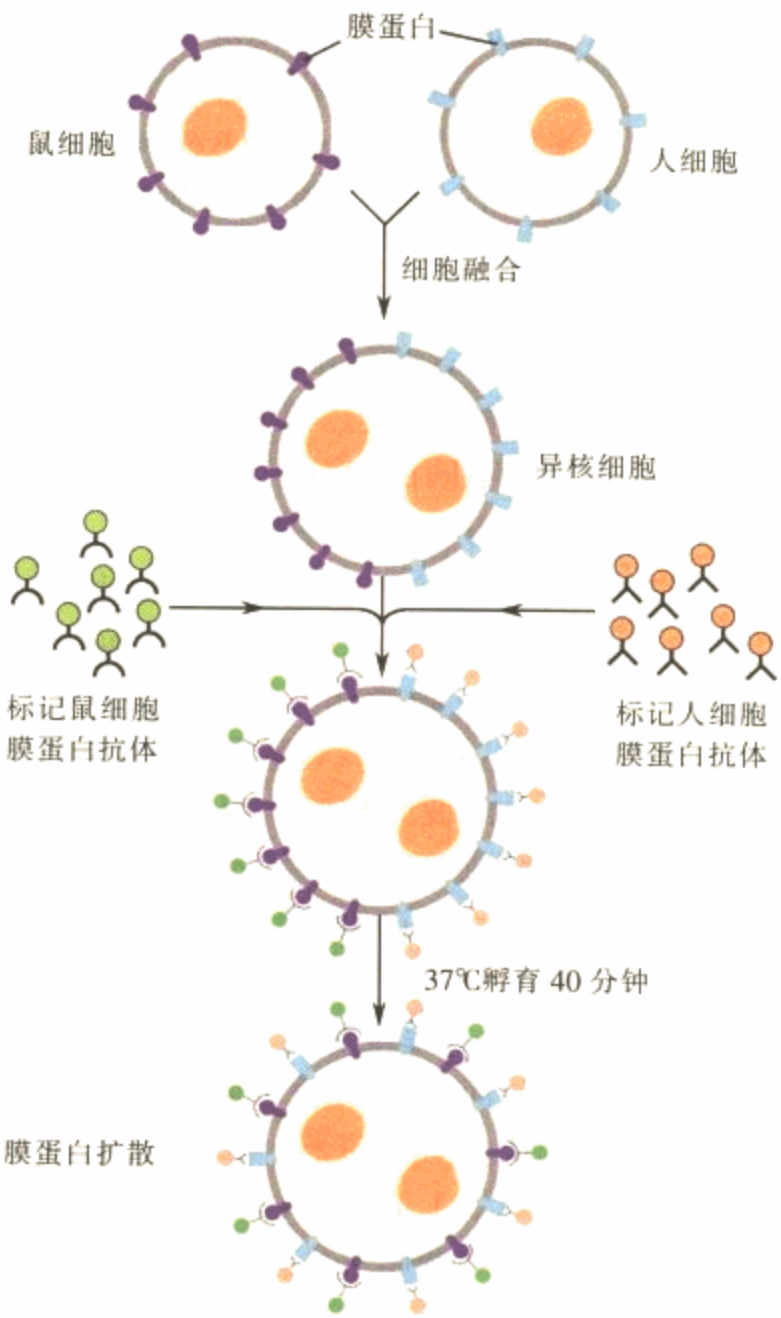
（5）膜蛋白的影响：膜脂结合膜蛋白后对膜的流动性有直接影响。膜蛋白嵌入膜脂疏水区后，使周围的脂类分子不能单独活动而形成界面脂（嵌入蛋白与周围脂类分子结合而形成），嵌入的蛋白越多，界面脂就越多，膜脂的流动性越小。

除上述因素外，膜脂的极性基团、环境温度、pH、离子强度及金属离子等均可对膜脂的流动性产生一定的影响。如环境温度越高，膜脂流动性越大，在相变温度范围内，每下降 10℃，膜的黏度增加 3 倍，因而膜流动性降低。

4. 膜蛋白的运动性　分布在膜脂二维流体中的膜蛋白也有发生分子运动的特性，其主要运动方式是侧向扩散和旋转运动。这两种分子运动方式与膜脂分子相似，但移动速度较慢。

（1）侧向扩散：许多实验证明，膜蛋白在膜脂中可以自由漂浮和在膜表面扩散。1970 年，约翰霍普金斯大学的 L. D. Frye 和 M. Edidin 用细胞融合和间接免疫荧光法证明，膜抗原（即膜蛋白）在脂双层二维平面中可以自由扩散。他们把体外培养的人和小鼠的成纤维

细胞进行融合，观察人-小鼠杂交细胞表面抗原分布的变化（图 4-11）。用发绿色荧光的荧光素标记小鼠成纤维细胞的特异性抗体，用发红色荧光的荧光素标记人成纤维细胞的特异性抗体。被标记的抗体分别与小鼠和人成纤维细胞膜上的抗原相结合。当这两种细胞在融合剂的作用下刚发生融合时，膜抗原蛋白只限于各自的细胞膜部分，人细胞一侧呈红色荧光，小鼠细胞一侧呈绿色荧光。37℃继续培养 40 分钟后，两种颜色的荧光在整个杂交细胞膜上均匀分布。这说明膜抗原蛋白在膜平面内经扩散运动而重新分布。但在低温条件下(1℃)，膜抗原则基本停止运动。



●图 4-11　小鼠-人细胞融合过程（示膜蛋白的运动性）

目前测定膜蛋白的侧向扩散常采用荧光光漂白恢复技术（fluorescence photobleaching recover，FPR）。这种方法是利用激光，使膜上某一微区结合有荧光素的膜蛋白被不可逆地漂白之后，当其他部位未被激光漂白的带有荧光的膜蛋白，由于侧向扩散，不断地进入这个被漂白的微区时，荧光又恢复。可用其恢复速度计算蛋白质分子的侧向扩散速率。不同膜蛋白其扩散速率不同，扩散系数（D）约为 $5\times10^{-9}cm^2/s\sim1\times10^{-12}cm^2/s$。所以一个分子量为 100kD 的内在膜蛋白，其扩散系数仅为膜脂扩散系数的 1/2 左右。

（2）旋转运动：或称旋转扩散，膜蛋白能围绕与膜平面相垂直的轴进行旋转运动，但旋转扩散的速度比侧向扩散更为缓慢。不同膜蛋白旋转速率也有很大差异，这与其分子结构及所处不同的微环境有关。

实际上不是所有的膜蛋白都能自由运动，有些细胞只有部分膜蛋白（30%~90%）处于流动状态。膜蛋白在脂双层中的运动还受到许多其他因素影响，如膜蛋白聚集形成复合物可使其运动减慢；膜整合蛋白与外周蛋白相互作用、膜蛋白与细胞骨架成分连接以及与膜脂的相互作用等，均限制了膜蛋白的运动性。如用细胞松弛素 B 处理细胞，阻断微丝的形成，可使膜蛋白流动性增强。膜蛋白周围膜脂的相态对其运动性有很大影响，处于不流动的晶态脂质区域的膜蛋白不易运动，而处于液晶态区的膜蛋白则易于发生运动。另外，膜蛋白在脂双层二维流体中的运动是自发的热运动，不需要能量。实验证明，用药物抑制细胞能量转换，膜蛋白的运动不会受到影响。

膜的流动性具有十分重要的生理意义。如物质运输、细胞识别、信息转导等功能都与膜的流动性有密切关系。生物膜各种功能的完成是在膜的流动状态下进行的，若膜的流动性低于一定域值，细胞膜固化、黏度增大到一定程度时，许多跨膜运输中断，膜内的酶丧失活性，代谢终止，最终导致细胞死亡。

三、细胞膜的分子结构模型

前面已初步论述了膜脂、膜蛋白的分子结构特点，但它们是如何排列和组织的，这些

成分之间是如何相互作用的？回答这些问题，对阐明膜的功能活动及机制十分重要。

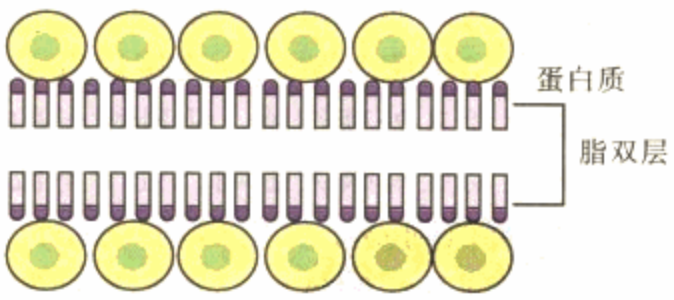
在分离质膜以前，有关膜的分子结构理论，一般是根据间接材料提出的。1890 年，苏黎世大学的 Ernest Overton 发现溶于脂肪的物质容易穿过膜，非脂溶性的物质不易穿过细胞膜，他据此推测细胞的表面有类脂层，初步明确了细胞膜的化学组成。1925 年，E. Gorter 和 F. Grendel 从血影（成熟红细胞溶血后剩下的一层细胞膜外壳）中抽提出磷脂，在水面上铺成单分子层，测得其所占面积与所用红细胞膜总面积之比大约是 2∶1，因此，他们认为红细胞膜是由双层磷脂分子组成。这样就第一次提出了脂双分子层是细胞膜基本结构的概念。脂双层的概念为后来大部分膜结构模型所接受，并在这一基础上提出了许多种不同的膜分子结构模型，现仅介绍以下几种主要的膜结构模型。

（一）片层结构模型

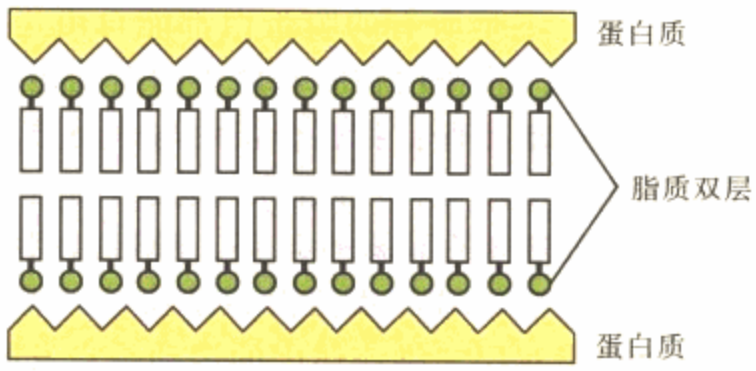
1935 年，James Danielli 和 Hugh Davson 发现细胞膜的表面张力显著低于油-水界面的表面张力，由于已知脂滴表面如吸附有蛋白成分则表面张力降低，因此他认为，细胞膜不是单纯由脂类组成，推测质膜中含有蛋白质成分。并提出“片层结构模型”（lamella structure model）。这一模型认为，细胞膜是由两层磷脂分子构成，磷脂分子的疏水烃链在膜的内部彼此相对，而亲水端则朝向膜的外表面，内外侧表面还覆盖着一层球形蛋白质分子，形成蛋白质-磷脂-蛋白质三层夹板式结构（图 4-12）。后来，为了解释质膜对水的通透性高，Danielli 对其模型进行了修改，认为质膜上有穿过脂双层的孔，小孔由蛋白质分子围成，其内表面具有亲水基团，允许水分子通过。这一模型的影响达 20 年之久。

（二）单位膜模型

前面所介绍的对质膜化学性质与结构的认识，都是根据分析实验数据间接推论出来的，缺少直观资料。由于细胞质膜非常薄，在光学显微镜下无法直接观察清楚。20 世纪 50 年代，J. D. Robertson 使用电子显微镜观察各种生物细胞膜和内膜系统，发现所有生物膜均呈“两暗夹一明”的三层式结构。在横切面上表现为内外两层为电子密度高的暗线，中间夹一条电子密度低的明线，内外两层暗线各厚约 2nm，中间的明线厚约 3.5nm，膜的总厚度约为 7.5nm，这种“两暗夹一明”的结构被称为“单位膜”（图 4-13）。因此，他们在片层结构模型基础上提出了“单位膜模型”（unit membrane model）。



●图 4-12　片层结构模型

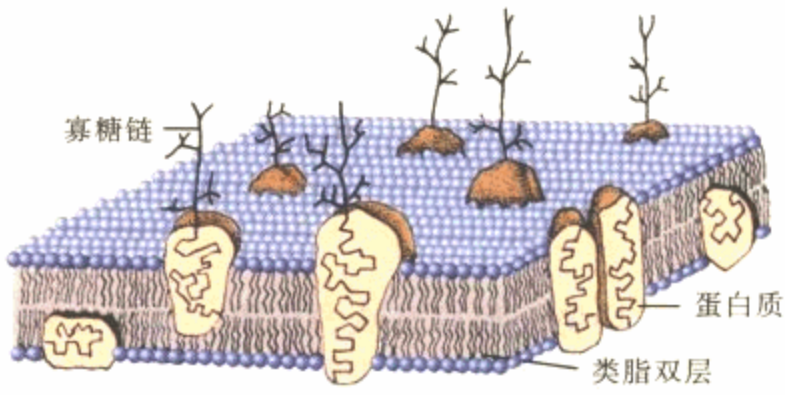


●图 4-13　单位膜模型

这一模型认为磷脂双分子层构成膜的主体，其亲水端头部向外，与附着的蛋白质分子构成暗线，磷脂分子的疏水尾部构成明线。这个模型与片层结构模型不同，认为脂双分子层内外两侧的蛋白质并非球形蛋白质，而是单条肽链以 β 片层形式存在的蛋白质，通过静电作用与磷脂极性端相结合。单位膜模型提出了各种生物膜在形态结构上的共同特点，即把膜的分子结构同膜的电镜图像联系起来，能对膜的某些属性作出解释，在超微结构中被普遍采用，名称一直沿用至今。但是这个模型把膜作为一种静态的单一结构，无法说明膜的动态变化和各种重要的生理功能，也不能解释为何不同生物膜的厚度不同。

（三）流动镶嵌模型

20 世纪 60 年代以后，由于新技术的发明和应用，对质膜的认识越来越深入。如应用冰冻蚀刻技术显示膜中有蛋白质颗粒存在；应用示踪法表明膜的结构形态不断发生流动变化；应用红外光谱、旋光色散等技术证明膜蛋白主要不是 β 片层结构，而是 α 螺旋的球形结构。这些事实都对单位膜模型提出了修正，此阶段又相继提出了许多新的模型，其中受到广泛支持的是 S. Jonathan Singer 和 Garth Nicolson 在 1972 年提出的“流动镶嵌模型”（fluid mosaic model）。这一模型认为膜中脂双层构成膜的连贯主体，它既具有晶体分子排列的有序性，又具有液体的流动性。膜中蛋白质分子以不同形式与脂双层分子结合，有的嵌在脂双层分子中，有的则附着在脂双层的表面。它是一种动态的、不对称的具有流动性结构。流动镶嵌模型强调了膜的流动性和不对称性，较好地解释了生物膜的功能特点，它是目前被普遍接受的膜结构模型（图 4-14）。



●图 4-14　流动镶嵌模型

流动镶嵌模型可以解释许多膜中所发生的现象，但它不能说明具有流动性的质膜在变化过程中怎样保持膜的相对完整性和稳定性，忽视了膜的各部分流动性的不均匀性等。因此又有人提出了一些新的模型。如 1975 年 D. F. Wallach 提出了一种“晶格镶嵌模型”（crystal mosaic model），认为生物膜中流动的脂类是在可逆地进行无序（液态）和有序（晶态）的相变，膜蛋白对脂类分子的运动具有限制作用。镶嵌蛋白和其周围的脂类分子形成膜中晶态部分（晶格），而具有“流动性”的脂类呈小片的点状分布。因此脂类的“流动性”是局部的，并非整个脂类双分子层都在进行流动，这就比较合理地说明了生物膜既具有流动性，又具有相对完整性及稳定性的原因。

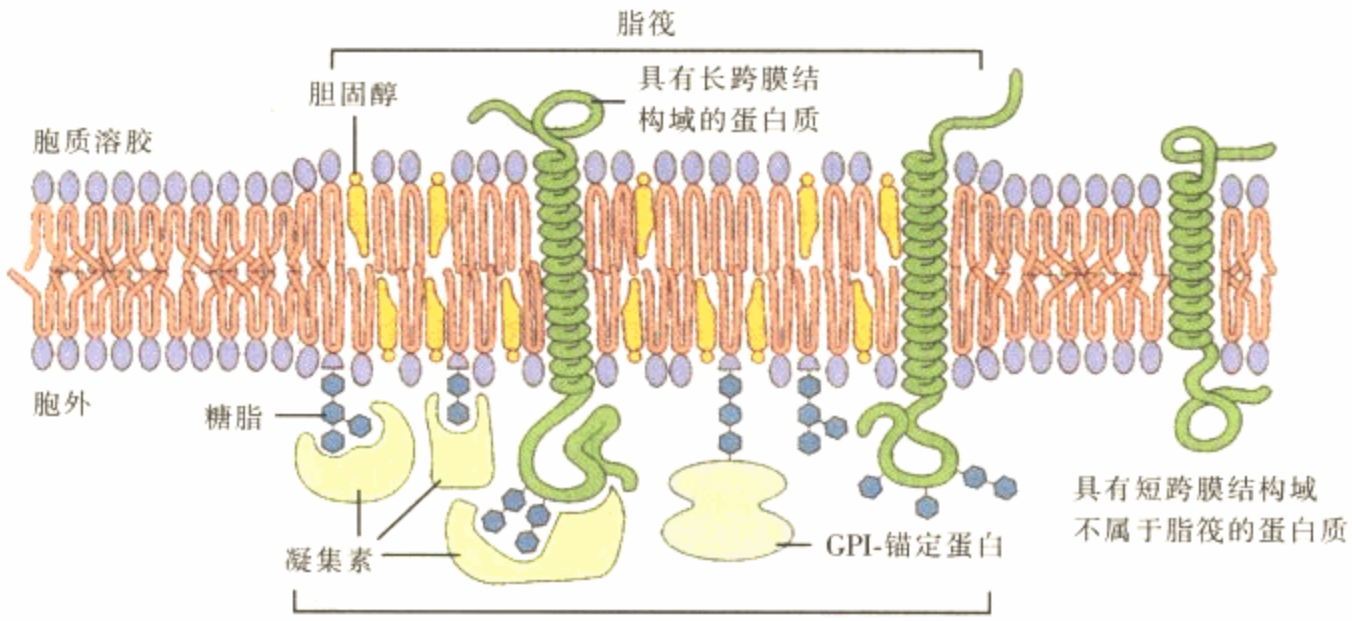
1977 年，M. K. Jain 和 H. B. White 又提出了“板块镶嵌模型”（block mosaic model），认为在流动的脂双层中存在许多大小不同、刚性较大的能独立移动的脂类板块（有序结构的“板块”），在这些有序结构的板块之间存在流动的脂类区（无序结构的“板块”），这两者之间处于一种连贯的动态平衡之中，因而生物膜是由同时存在不同流动性的板块镶嵌而成的动态结构。

事实上，后两种模型与流动镶嵌模型并无本质区别，不过是对膜流动性的分子基础进行了补充。

（四）脂筏模型

脂质双分子层近似一个二维流体，里面镶嵌有许多的蛋白质。而在真实的细胞膜上，脂质双分子层不是一个完全均匀的二维流体，一些脂质分子可以形成相对稳定的凝胶状态或液态有序状态。近来发现膜质双层内含有由特殊脂质和蛋白质组成的微区，微区中富含胆固醇和鞘脂，其中聚集一些特定种类的膜蛋白。这些区域比膜的其他部分厚，更有秩序且较少流动，被称为“脂筏”。脂筏周围则是富含不饱和磷脂的流动性较高的液态区。近年发现脂筏不仅存在于质膜上，亦存在于高尔基复合体膜上（图 4-15）。

脂质双层具有不同的脂筏结构：外层的微区主要含有鞘脂、胆固醇及 GPI-锚定蛋白，由于鞘脂含有长链饱和脂肪酸，流动性较差，而邻近的磷脂区其脂肪酸多不饱和，所以出现相分离；内层也有类似的微区，但与外层的脂质不完全相同，主要是在此区有许多酰化的锚定蛋白，特别是信号传导蛋白，如 Src、酪氨酸激酶等。脂筏中的脂类与相关的蛋白质在膜平面可进行侧向扩散。从结构及组分分析，脂筏在膜内形成一个有效的平台，它有两个特点：许多蛋白质聚集在脂筏内，便于相互作用；脂筏提供一个有利于蛋白质变构的



●图 4-15　脂筏结构模式图

环境，形成有效的构象。目前比较公认的脂筏的功能是参与信号转导、受体介导的内吞作用以及胆固醇代谢运输等。从当前的研究来看，脂筏功能的紊乱已涉及 HIV、肿瘤、动脉粥样硬化、Alzheimer 病、疯牛病及肌营养不良等疾病，对脂筏结构和功能的研究不仅加深了对许多重要的生命现象和病理机制的了解，而且也有助于了解细胞膜的结构和功能，将给膜生物学带来更多的信息与启示。

第二节　小分子物质的跨膜运输

细胞是生命的基本单位，在细胞进行各种生命活动中，必然要与环境进行活跃的物质交换。通过质膜从细胞外环境中跨膜运输所需要的各种营养物质和 O_2，并将代谢产物排至细胞外。细胞膜是细胞与细胞外环境间的半透性屏障，对跨膜运输的物质有选择和调节功能，以维持细胞相对稳定的内环境。质膜对所运输物质通透性的高低取决于质膜固有的脂溶性和物质本身的特性。由于脂双分子层的中间部分是疏水性结构，因而脂溶性分子和小的不带电荷的分子能自由扩散通过质膜；脂双层对绝大多数溶质分子和离子是高度不通透的，它们的跨膜转运由质膜上一套特殊的膜转运蛋白完成。另外，细胞还存在转运大分子物质甚至颗粒物质通过细胞膜的途径。已知细胞对小分子和离子的跨膜运输有几条不同途径：通过脂双层的简单扩散、离子通道扩散、易化扩散和主动运输。通过胞吞和胞吐作用进行大分子和颗粒物质的运输。

一、膜的选择性通透和简单扩散

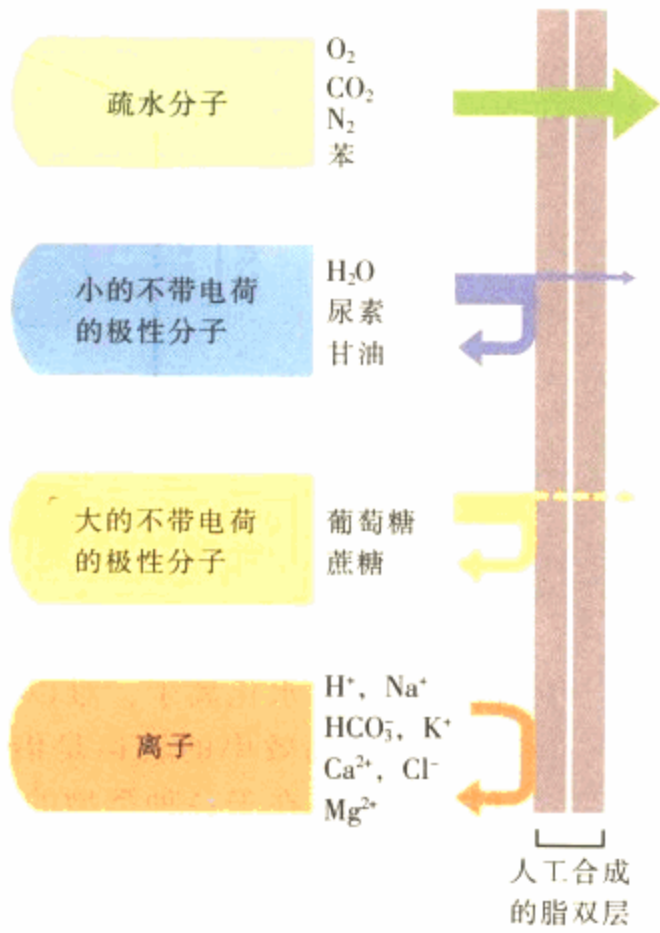
通常采用人工脂双层膜研究细胞膜对小分子和离子的通透性。如果给予足够时间，实际上任何小分子都可以从高浓度向低浓度方向通过人工脂双层膜，但是不同分子通过脂双层的扩散速率不同，主要取决于分子的大小和它在脂质中的相对溶解度。一般说来，分子量越小、脂溶性越强，通过脂双层膜的速率越快。非极性的小分子如 O_2 易溶于脂双层中，可以迅速通过脂双层膜，不带电荷的极性小分子如 H_2O 和尿素也能迅速通过脂双层膜。但较大的分子如甘油通过较慢，葡萄糖则几乎不能通过。水分子虽不溶于脂中，却能迅速通过脂双层，这是由于水分子非常小，且不带电荷。脂双层对于所有带电荷的分子（离子），不管它多么小，都是高度不通透的，这些分子所带电荷及高度的水合状态妨碍它们进入脂

双层的疏水区域，如 Na^+、K^+对人工脂双层膜的通透性仅为水的 10^{-9} 倍（图 4-16）。

简单扩散（simple diffusion）是小分子物质跨膜运输的最简单的方式。小分子的热运动可使分子以自由扩散的方式从膜的一侧通过质膜进入另一侧。但必须满足两个条件：一是溶质在膜两侧保持一定的浓度差，二是溶质必须能透过膜。脂溶性物质如醇、苯、甾类激素以及 O_2、CO_2、NO 和 H_2O 等就是通过简单扩散方式穿过细胞膜的。在简单扩散时，溶质分子直接溶解于膜脂双层中，通过质膜进行自由扩散，不需要跨膜运输蛋白协助。转运是由高浓度向低浓度方向进行，所需要的能量来自高浓度本身所包含的势能，不需细胞提供能量，故也称被动扩散（passive diffusion）。这种物质从高浓度向低浓度的穿膜运动，符合物理学上的简单扩散规律，最终消除两个区域之间的浓度差。

扩散速率除依赖浓度梯度的大小以外，还同物质的油/水分配系数和分子大小有关。某种物质对膜的通透性（P）可以根据它在油和水中的分配系数（K）及其扩散系数（D）来计算：

$$P=KD/t$$，t 为膜的厚度。



● 图 4-16　人工脂双层对各种分子的相对通透性

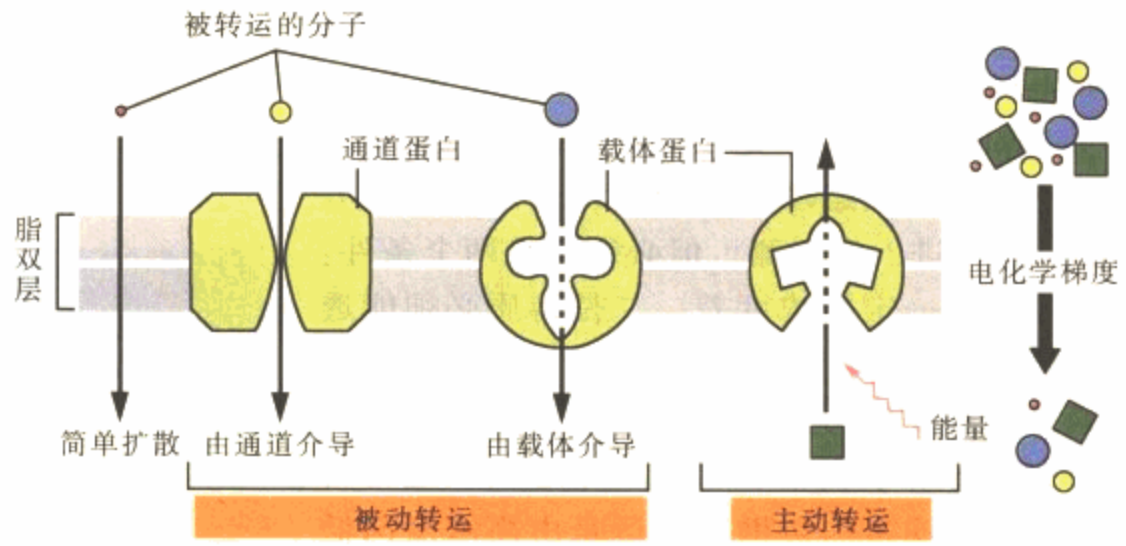
二、膜转运蛋白介导的跨膜运输

如上所述，水及非极性分子通过简单扩散作用即能通过细胞膜，但绝大多数溶质如各种离子、葡萄糖、氨基酸、核苷酸及许多细胞代谢产物都不能通过简单扩散穿膜转运。现在知道细胞膜中有特定的膜蛋白负责转运这些物质，这类蛋白质称为膜转运蛋白（membrane transport protein）。所有膜转运蛋白都是跨膜蛋白，它们的肽链穿越脂双层，能使被转运的物质通过细胞膜。通常每种膜转运蛋白只转运一种特定类型的溶质（如离子、糖或氨基酸）。

膜转运蛋白主要有两类：一类为载体蛋白（carrier protein），一类是通道蛋白（channel protein）。载体蛋白与特定的溶质结合，改变构象使溶质穿越细胞膜。通道蛋白形成一种水溶性通道，贯穿脂双层，当通道开放时特定的溶质（一般是无机离子）可经过通道穿越细胞膜。所有通道蛋白和许多载体蛋白介导溶质穿过膜转运是被动的，称为被动运输（passive transport）。如果转运的溶质是不带电荷的，膜两侧的浓度梯度决定溶质的转运方向（顺浓度梯度）；如被转运的溶质带有净电荷，跨膜物质浓度梯度及电位梯度的总和构成的电化学梯度，决定溶质转运方向（顺电化学梯度）。当细胞外的溶质浓度高于细胞内，并且质膜中存在相应的通道或载体蛋白时，则该溶质将以被动运输的方式穿过质膜进入细胞内，此过程中转运蛋白不消耗代谢能，消耗的是存在于浓度梯度中的势能。然而，细胞也需要逆电化学梯度转运一些溶质，这时不但需要转运蛋白的参与，还需要消耗能量（多数是指 ATP），我们把细胞膜的这种利用代谢产生的能量来驱动物质的逆浓度梯度的转运称为主动运输（active transport）。载体蛋白既可介导被动运输（易化扩散），也可介导逆电化学梯度的主动运输；而通道蛋白只能介导顺电化学梯度的被动运输（图 4-17）。

（一）离子通道高效转运各种离子

脂双层结构是亲水分子和带电离子跨膜转运的限制性屏障。如 Na^+、K^+、Ca^{2+}、Cl^-等

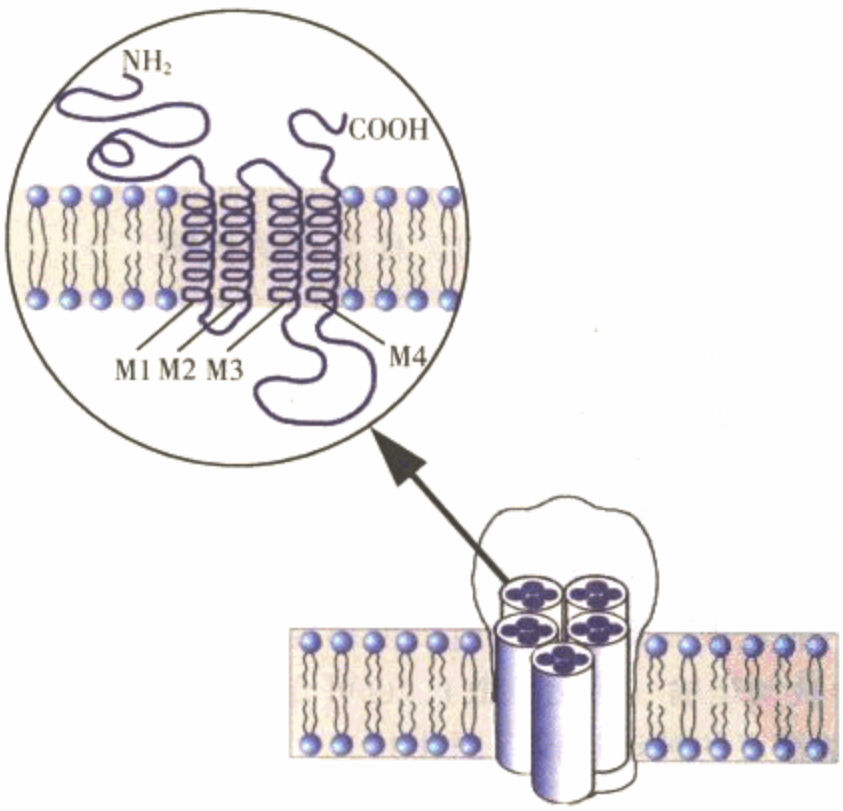


●图 4-17　被动运输和主动运输

极性很强的水化离子，难以直接穿膜转运，但各种离子的穿膜速率很高，可在数毫秒内完成，这种高效率的转运是借助膜上的通道蛋白完成的。目前已发现的通道蛋白有 100 余种，普遍存在于各种类型的真核细胞质膜以及细胞内膜上。因为这些通道蛋白都与离子的转运有关，所以通道蛋白也称为离子通道（ion channel）。

离子通道多为膜蛋白复合体，与载体蛋白不同，它们可以在膜上形成亲水性的跨膜孔道，快速并有选择地让某些离子通过而扩散到质膜的另一侧。通道蛋白有以下几个特点：①通道蛋白介导的是被动运输，溶质通过水溶性通道从高浓度向低浓度方向自由扩散，通道蛋白在转运过程中不与溶质分子结合。②离子通道对被转运离子的大小和所带电荷都有高度的选择性。只有大小和电荷适宜的离子才能通过。例如 K^+离子通道只允许 K^+通过，而不允许 Na^+通过。③转运速率高，通道可以在每秒中内允许 10^6~10^8 个特定离子通过，比载体蛋白所介导的最快转运速率高约 1 000 倍。④多数离子通道不是持续开放，离子通道开放受“闸门”控制，即离子通道的活性由通道开或关两种构象所调节，以对一定的信号做出适当的反应。

通道的开放与关闭受细胞内外多种因素的调控，被称为“门控”，如同一扇门的开启和关闭。通常根据通道门控机制的模式不同和所通透离子的种类将门控通道大致分为三大类。



●图 4-18　乙酰胆碱受体模式图

（1）配体门控通道：配体门控通道（ligand-gated channel）实际上是离子通道型受体，它们与细胞外的特定配体（ligand）结合后，发生构象改变，结果将“门”打开，允许某种离子快速穿膜扩散。

乙酰胆碱受体（acetylcholine receptor，nAChR）是典型的配体门控通道（图 4-18）。它是由 4 种不同亚单位组成的五聚体跨膜蛋白（$\alpha_2\beta\gamma\delta$），每个亚单位均由一个大的跨膜 N 端（约 210aa），4 段跨膜序列（M1~M4）以及一个短的胞外 C 端组成。各亚单位通过氢键等非共价键形成一个结构为 $\alpha_2\beta\gamma\delta$ 的梅花状通道结构，乙酰胆碱（ACh）在其受体上有两个结合位点。在无 ACh 结合的情况下，受体各亚基中的 M2 共同组成的孔区处于关闭状态，此时，M2 亚基

上的亮氨酸残基伸向孔内形成一个纽扣结构。一旦 ACh 与受体结合，便会引起孔区的构象改变，M2 亚基上的亮氨酸残基从孔道旋转出去，其形成的孔径大小足以使膜外高浓度的 Na^+内流，同时使膜内高浓度的 K^+外流。结果使得该处膜内外电位差接近于 0 值。

继 nAChR 之后，又陆续发现了其他神经递质受体，如 γ 氨基丁酸（$GABA_A$ 和$GABA_C$）受体、甘氨酸（Gly）受体、5-羟色胺（5-HT）受体以及一类谷氨酸门控阴离子通道(GluCl 受体)，它们都是由单一肽链反复 4 次穿膜（M1~M4）形成一个亚单位，并由 5 个亚单位组成的跨膜离子通道。这些配体门控通道具有很高的序列结构相似性，归属于 cys-loop 受体超家族，但它们对离子的选择性通透却各行其是。例如，5-HT 受体与 nACh 受体可选择性地通透 Na^+、K^+和 Ca^{2+}等阳离子。$GABA_A$ 和 $GABA_C$ 受体、Gly 受体、GluCl 受体则主要对 Cl^-通透。

（2）电压门控通道：膜两侧跨膜电位的改变是控制电压门控通道（voltage-gated channel）开放与关闭的直接因素。此类通道蛋白的分子结构中存在着一些对跨膜电位改变敏感的基团或亚单位，可诱发通道蛋白构象的改变，从而将“门”打开，一些离子顺浓度梯度自由扩散通过细胞膜。闸门开放时间非常短，只有几毫秒时间，随即迅速自发关闭。电压门控通道主要存在于神经元、肌细胞及腺上皮细胞等可兴奋细胞，包括钾通道、钙通道、钠通道和氯通道。

（3）应力激活通道：应力激活通道（stress-activated channel）是通道蛋白感应力而改变构象，开启通道使“门”打开，离子通过亲水通道进入细胞，引起膜电位变化，产生电信号。如内耳毛细胞顶部的听毛在受到切应力的作用产生弯曲时，使应力门控通道开放，允许离子进入内耳毛细胞，从而将声波信号传递给听觉神经元。目前关于应力激活通道的研究相对较少，从细菌和古细菌克隆的应力激活通道均为两段跨膜蛋白，整个通道呈五聚体结构模式，易通透阳离子。现将离子通道种类及功能总结于表 4-1。

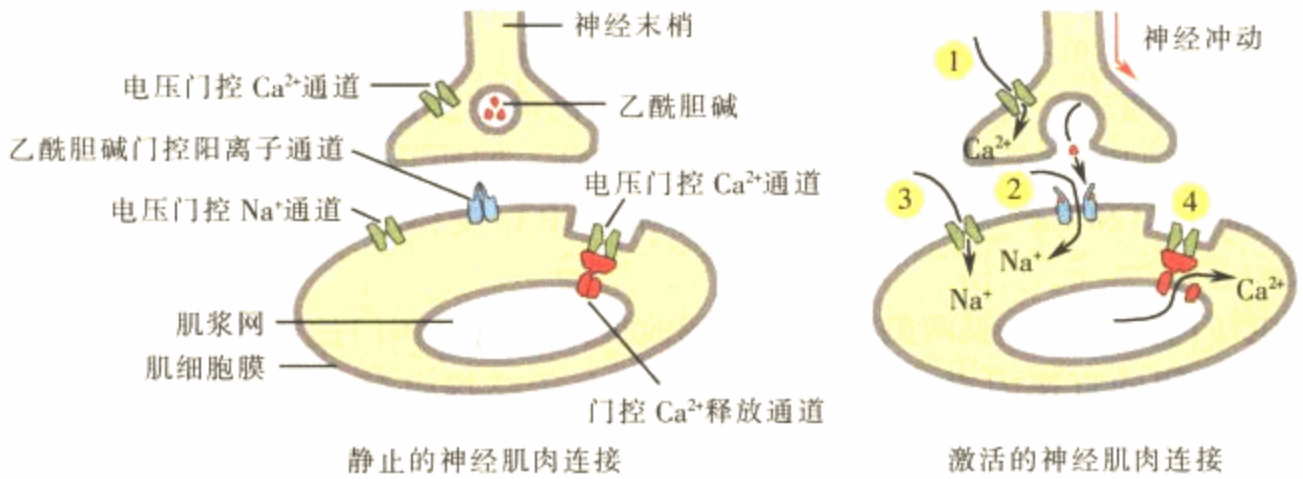
表 4-1　主要的离子通道类型

离子通道	典型位置	功　能
K^+漏通道	大多数动物细胞质膜	维持静息膜电位
电压门控 Na^+通道	神经细胞轴突质膜	产生动作电位
电压门控 K^+通道	神经细胞轴突质膜	在一个动作电位之后使膜恢复静息电位
电压门控 Ca^{2+}通道	神经终末的质膜	激发神经递质释放(将电信号转换为化学信号)
乙酰胆碱受体通道(乙酰胆碱 Na^+和 Ca^{2+}通道)	肌细胞(在神经肌肉接头处)质膜	兴奋性突触信号(在靶细胞将化学信号转换为电信号)
GABA 受体(GABA 门控 Cl^-通道)	许多神经元的质膜(突触处)	抑制性突触信号
应力激活阳离子通道	内耳听觉毛细胞	感受声波震动

一些离子通道是持续开放的（如 K^+漏通道），但是大多数离子通道的开放是受“闸门”控制，开放时间短暂，只有几毫秒，随即关闭。这种特性有利于一些顺序性活动，例如，一个通道短暂的开放使离子流入，可引起另一个通道开放，前一个通道迅速关闭，后者又可顺次影响其他通道开放。离子通道的开放和关闭常常是连续相继的过程，其开放和关闭快速切换，以调节细胞的活动。

下面以神经-肌接头处神经冲动的传导引发肌肉收缩为例，说明离子通道的活动。①当神经冲动传至神经末梢时，引起细胞去极化，导致细胞膜上的电压门控 Ca^{2+}通道瞬时开放，由于细胞外 Ca^{2+}浓度大大高于细胞内，所以大量的 Ca^{2+}从开放的 Ca^{2+}通道涌入细胞内，引起突触小泡中神经递质乙酰胆碱释放至突触间隙内。②释放的乙酰胆碱与突触后肌细胞膜上的 nAChR 结合，促使其开放形成一个阳离子通道，Na^+流入肌细胞内，引起细胞

膜局部去极化。③肌细胞膜去极化诱发膜上电压门控 Na^+ 离子通道短暂开放，大量 Na^+ 涌入肌细胞内，使肌细胞膜进一步去极化，并扩散到整个肌细胞膜。④肌细胞膜去极化，使肌浆网上 Ca^{2+} 通道开放，Ca^{2+} 大量释放入肌细胞内使肌浆中 Ca^{2+} 浓度突然增加，引起肌原纤维的收缩（图 4-19）。

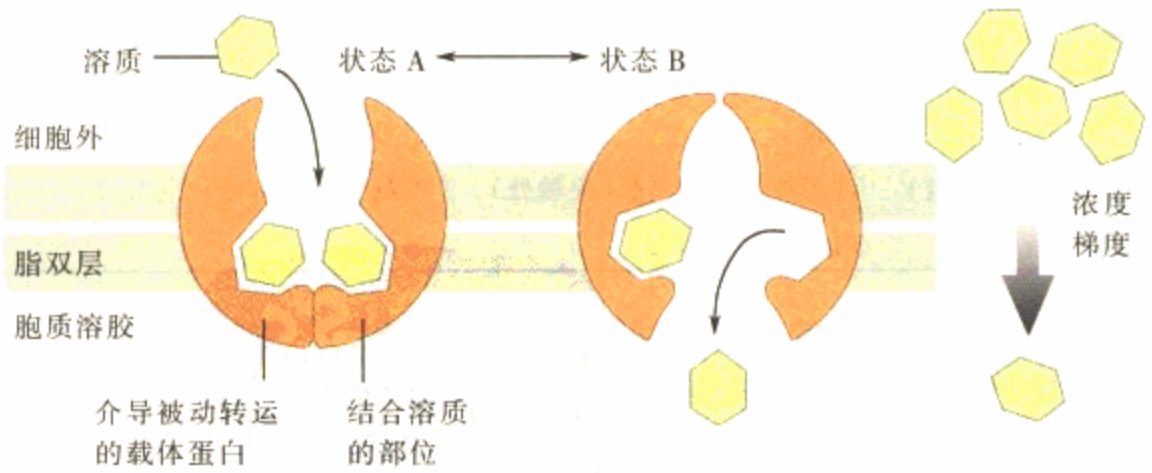


●图 4-19　神经-肌接头处的离子通道

（二）载体蛋白介导的易化扩散

一些非脂溶性（或亲水性）的物质，如葡萄糖、氨基酸、核苷酸以及细胞代谢物等，不能以简单扩散的方式通过细胞膜，但它们在载体蛋白的介导下，不消耗细胞的代谢能量，顺物质浓度梯度或电化学梯度进行转运，这种方式称为易化扩散（facilitated diffusion）或帮助扩散。由于易化扩散不消耗细胞的代谢能，与简单扩散相同，二者都被称为被动运输。但在易化扩散中，转运特异性强，转运速率也非常快。

目前对载体蛋白在分子水平上如何发挥作用的细节还不清楚，一般认为，载体蛋白对所结合的溶质具有高度专一性，可以借助于其上的结合位点与某一物质进行暂时的、可逆的结合。当载体蛋白一侧表面的特异结合位点同专一的溶质分子结合形成复合体时，即可引起载体蛋白发生构象变化，通过一定的易位机制，将被运送的溶质分子从膜的一侧移至膜的另一侧。同时，随构象的变化，载体对该物质的亲和力也下降，于是物质与载体分离而被释放。载体蛋白又恢复到它原有的构象（图 4-20）。

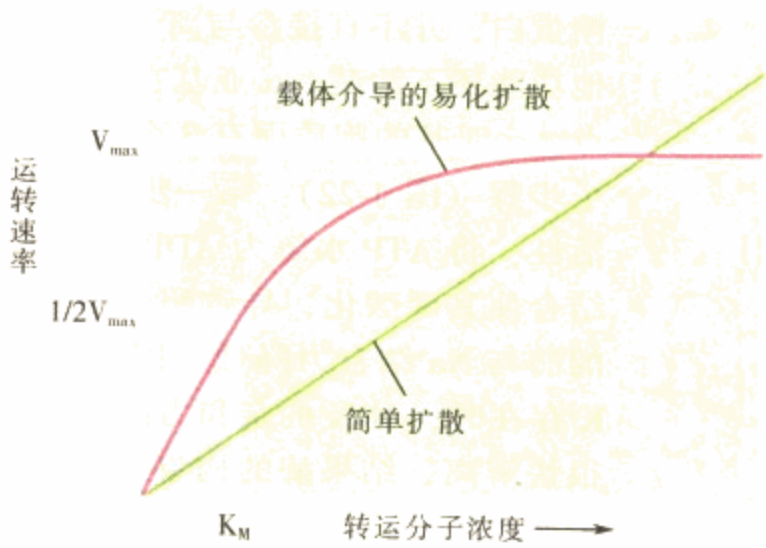


●图 4-20　载体蛋白介导的易化扩散示意图

葡萄糖是人体最基本的直接能量来源，在许多细胞，包括红细胞，细胞外葡萄糖浓度高于细胞内，通过易化扩散方式将葡萄糖转运入细胞。人类基因组编码 12 种与糖转运相关的载体蛋白 GLUT1~GLUT12，构成葡萄糖载体（glucose transporter，GLUT）蛋白家族。它们具有高度同源的氨基酸序列，都含有 12 次跨膜的 α-螺旋。对 GLUT1 的研究发现，多肽跨膜段主要由疏水性氨基酸残基组成，但有些 α-螺旋带有 Ser、Thr、Asp 和 Glu 残基，

它们的侧链可以和葡萄糖羟基形成氢键。这些氨基酸残基被认为可以形成载体蛋白内部朝内和朝外的葡萄糖结合位点。人红细胞膜上存在约有 5 万个葡萄糖载体蛋白，其数量相当于膜总蛋白量的 5%，最大转运速度约为每秒转运 180 个葡萄糖分子。葡萄糖载体蛋白的三维结构还不清楚，因此葡萄糖转运机制还是一个谜。动力学研究表明葡萄糖的转运是通过载体蛋白的两种构象交替改变而完成的，因为载体蛋白是一种多次跨膜蛋白，它们不可能通过在脂双层中来回移动或翻转以转运物质分子。在第一种构象，葡萄糖结合位点朝向细胞外，结合葡萄糖之后，诱导其构象发生改变，使葡萄糖结合位点转向细胞内，释放葡萄糖入细胞，随后又恢复原先的构象，这样不断地将葡萄糖转运入细胞。大多数哺乳类细胞都含有一种协助葡萄糖从血液扩散到细胞的膜蛋白。

用红细胞和肝细胞设计葡萄糖摄取实验，发现由 GLUT 蛋白所介导的细胞对葡萄糖的摄取表现出酶动力学基本特征。这个过程类似于酶和底物反应，载体蛋白的作用如同一个特异性的膜结合酶。因此，有人将载体蛋白称为通透酶（permease）。载体蛋白对溶质分子（底物）有特定的结合部位，当所有的结合部位均被溶质分子占据，这时的转运速率达到最大值（V_{max}）。而每种载体蛋白对它所结合的溶质都有一定的结合常数(K_m)，这相当于转运率达到最大值的 1/2 时溶质的浓度。所以易化扩散的速率在一定限度内同溶质的浓度差成正比，当扩散率达一定水平，就不再受溶质浓度的影响。与之相比，简单扩散的速率总是与溶质浓度差呈正比（图 4-21）。与酶一样，载体蛋白和溶质的结合可被竞争性抑制剂所阻断，这些抑制剂能占据载体蛋白的结合部位，但不一定被转运。载体蛋白与溶质分子的结合部位也可被非竞争性抑制剂破坏，这些抑制剂能改变载体蛋白的构象，使其不能与溶质分子结合。



●图 4-21　简单扩散与易化扩散的比较

（三）载体蛋白介导的主动运输

被动运输只能顺浓度梯度跨膜转运物质，趋向于使细胞内外的物质浓度达到平衡。但实际上细胞内外许多物质浓度存在很大差异。一般情况下，细胞内的 K^+浓度约为100mmol/L，而细胞外的 K^+浓度只有 5mmol/L。因此，在质膜两侧就有一个很“陡”的K^+浓度梯度，有利于 K^+扩散到细胞外。Na^+在质膜两侧的分布正好相反，细胞外的浓度为 150mmol/L，而细胞内则为 10~20mmol/L。Ca^{2+}在质膜两侧的分布的差别就更大，一般情况下，真核细胞细胞外的 Ca^{2+}浓度要高于细胞内约 1 000 倍。细胞无论是通过简单扩散还是易化扩散，都不能在质膜两侧建立如此陡的浓度梯度。这些浓度梯度由主动运输产生，以维持细胞内外物质浓度的差异，这对维持细胞生命活动至关重要。

主动运输是载体蛋白介导的物质逆浓度梯度或电化学梯度，由低浓度一侧向高浓度一侧进行的跨膜转运方式。转运的溶质分子其自由能变化为正值，因此需要与某种释放能量的过程相耦联。主动运输需要能选择性结合特定溶质分子的载体蛋白，还要消耗代谢能。能量来源包括 ATP 水解、光吸收、电子传递、顺浓度梯度的其他物质的流动等。

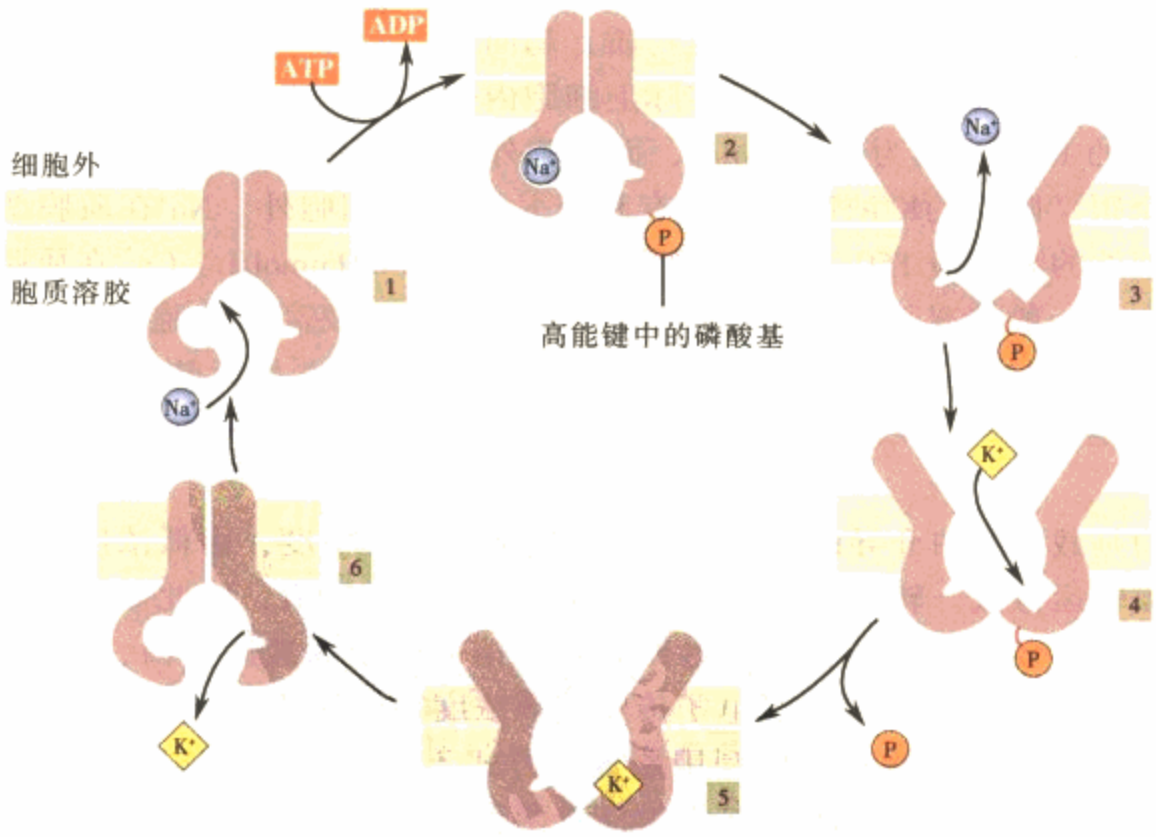
动物细胞根据主动运输过程中利用能量的方式不同，主动运输可分为：由 ATP 直接提供能量（ATP 驱动泵）和 ATP 间接提供能量两种主要类型。

1. 离子泵直接水解 ATP 进行主动运输　为了解释细胞逆浓度梯度排出 Na^+、吸收 K^+的机制，1957 年 A. L. Hodgkin 和 R. D. Keynes 最先提出离子泵模型。随后 J. C. Skou 发现了一种酶，在有 Na^+、K^+、Mg^{2+}存在时，它能催化 ATP 水解成 ADP 和焦磷酸，同时 Na^+和

K^+以逆浓度梯度方向进行穿膜运输，所以称为 Na^+-K^+-ATP 酶（Na^+-K^+-ATPase）。后来发现有一种 Na^+-K^+泵的抑制剂乌本苷（ouabain），它也能抑制 Na^+-K^+-ATP 酶，这样就把 Na^+-K^+-ATP 酶和 Na^+-K^+泵联系起来。研究发现，这个酶广泛存在于动物和植物细胞中，只要有 Na^+、K^+主动转运的地方，就能测到这种酶的活力，酶的活动和泵的活动成正比。因此，离子泵实际上就是膜上的一种ATP 酶（ATPase）。它可以利用水解 ATP 提供的能量，实现离子或小分子逆浓度或电化学梯度的跨膜运动，即离子或小分子逆电化学梯度的“上山”运动（需要能量），与 ATP 水解（释放能量）相耦联，是直接利用水解 ATP 提供能量的主动运输，每秒转运的离子数为 10^0~10^3 不等。

在质膜上，作为泵的 ATP 酶都具有专一性，不同的 ATP 酶运输不同的离子。同时运输 Na^+、K^+的，叫 Na^+-K^+泵（Na^+-K^+ pump）或钠泵；运输 Ca^{2+}的叫 Ca^{2+}泵（Ca^{2+} pump）等。

（1）Na^+-K^+泵：Na^+-K^+泵实际上就是 Na^+-K^+-ATP 酶，镶嵌在质膜脂双层中，具有载体的功能和酶的活性。可用生化方法从多种细胞膜上分离和提纯。Na^+-K^+-ATP 酶是由 2 个 α 亚基和 2 个 β 亚基组成的四聚体。α 亚基为大亚基，分子量为 120kD，是一个多次跨膜的膜整合蛋白，具有 ATP 酶活性。β 亚基为小亚基，分子量为50kD，是具有组织特异性的糖蛋白，并不直接参与离子的跨膜运动，但能帮助在内质网新合成的 α 亚基进行折叠，其他功能还不清楚。α 亚基在膜外表面有 2 个高亲和 K^+结合位点，也是乌本苷高亲和结合位点。α 亚基的胞质面有 3 个高亲和 Na^+结合位点，可以结合 3 个 Na^+。其作用过程可分为两个步骤（图 4-22）：第一步，在细胞膜内侧，Na^+与 Na^+-K^+-ATP 酶结合后，激活了 ATP 酶活性，将 ATP 水解为 ADP 和高能磷酸根，磷酸根与 α 亚基上的一个天冬氨酸残基酶共价结合使其磷酸化，导致酶蛋白发生构象改变，与 Na^+结合的部位转向膜外侧，这种磷酸化的酶与 Na^+结合力降低，因而在膜外侧释放 Na^+。第二步，改变构象的 ATP 酶，在膜外有 K^+存在时，对 K^+的亲和力高并与之结合，K^+与磷酸化的酶结合后促使其去磷酸化，磷酸根很快解离，结果酶的构象又恢复原状，并失去对 K^+的亲和力，将 K^+释放到胞内，完成整个循环。



●图 4-22　Na^+-K^+-ATP 酶活动示意图

1. Na^+结合到酶上；2. 酶磷酸化；3. 酶构象变化，Na^+释放到细胞外；4. K^+结合到外表面；5. 酶去磷酸化；6. 酶构象恢复原始状态，K^+释放到细胞内

水解一个 ATP 分子，可输出 3 个 Na^+，转入 2 个 K^+。Na^+依赖的磷酸化和 K^+依赖的去磷酸化如此有序地交替进行，每秒钟可发生约 1 000 次构象变化。当 Na^+-K^+泵抑制剂乌本苷在膜外侧占据 K^+的结合位点后，Na^+-K^+-ATP 酶活性可被抑制；当抑制生物氧化作用的氰化物使 ATP 供应中断时，Na^+-K^+泵失去能量来源而停止工作。大多数动物细胞要消耗 1/3 的 ATP（神经细胞要消耗 2/3 的总 ATP）用于维持 Na^+-K^+泵的活动，从而维持细胞内低 Na^+高 K^+的离子环境。这种状态的维持有重要的生理意义，如维持渗透压、维持恒定的细胞体积、产生和维持膜电位、为某些物质的吸收提供驱动力和为蛋白质合成及代谢活动提供必要的离子浓度等。

（2）Ca^{2+}泵：真核细胞细胞质中含有极低浓度的 Ca^{2+}（$\leqslant 10^{-7}$mol/L），而细胞外 Ca^{2+}浓度却高得多（约 10^{-3}mol/L）。细胞内外的 Ca^{2+}浓度梯度部分是由膜上的 Ca^{2+}泵维持的。像 Na^+-K^+泵一样，Ca^{2+}泵也是 ATP 酶，在 Ca^{2+}泵工作周期中，Ca^{2+}-ATP 酶也有磷酸化和去磷酸化过程，通过两种构象改变，结合与释放 Ca^{2+}。Ca^{2+}的工作与 ATP 的水解相耦联，每水解一个 ATP 分子，能逆浓度梯度转运 2 个 Ca^{2+}进入肌浆网或泵出细胞。维持细胞内外较大的 Ca^{2+}浓度差对细胞的正常生命活动是非常重要的。细胞外信号只要引起少量 Ca^{2+}进入细胞，即可引起胞内游离 Ca^{2+}显著升高，这能控制细胞的许多重要活动，如肌肉收缩、细胞分泌、神经递质释放、跨膜信号转导等。

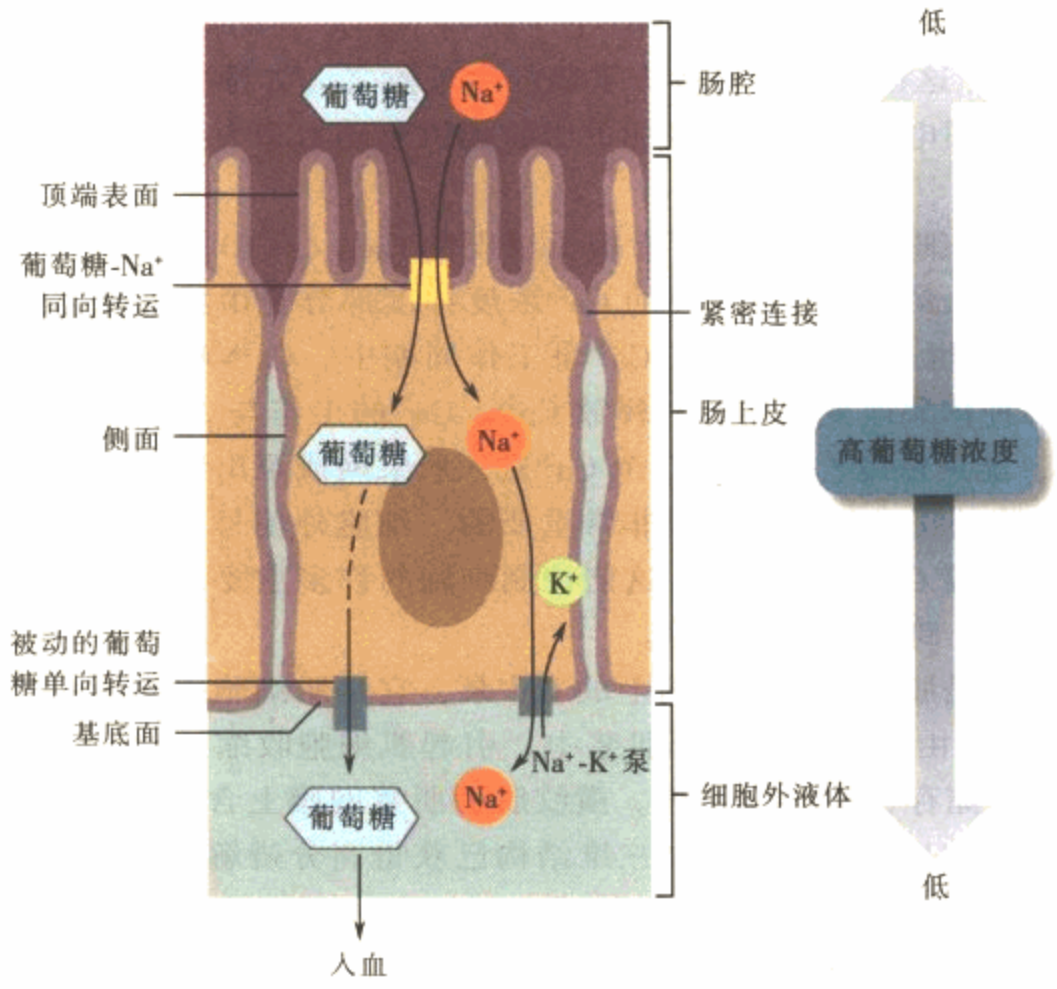
目前了解较多的是肌细胞内肌浆网上的 Ca^{2+}泵，它是肌细胞内储存 Ca^{2+}的场所。当肌细胞膜去极化时，Ca^{2+}由肌浆网释放到肌浆中，引起肌细胞收缩，然后通过 Ca^{2+}泵又迅速将 Ca^{2+}泵回肌浆网内储存，使肌肉弛缓。横纹肌的肌浆网膜上含有大量Ca^{2+}泵，占膜蛋白总量的 80%。现对肌浆网膜上的 Ca^{2+}泵三维结构已获得高分辨解析，它是 10 次跨膜的 α-螺旋多肽链，大约由 1 000 个氨基酸残基构成，与 Na^+-K^+-ATP 酶的 α 亚基同源，说明这两种离子泵在进化上有一定关系。

2. 离子浓度驱动的协同运输　细胞所建立的各种浓度梯度，如 Na^+、K^+和 H^+浓度梯度，是储存自由能的一种方式。储存在离子浓度梯度中的势能可以供细胞以各种途径来做功。协同运输（cotransport）是一类由 Na^+-K^+泵（或 H^+泵）与载体蛋白协同作用，间接消耗 ATP 所完成的主动运输方式。物质跨膜运动所需要的直接动力来自膜两侧离子的电化学梯度，而维持这种离子电化学梯度则是通过 Na^+-K^+泵（或 H^+泵）消耗 ATP 所实现的。动物细胞是利用膜两侧的 Na^+电化学梯度来驱动，植物细胞和细菌是利用 H^+电化学梯度来驱动。它是与离子梯度相耦联的主动运输。根据溶质运输方向与 Na^+顺电化学梯度转移方向的关系，又可分为同向运输（symport）与对向运输(antiport)。

协同运输过程由特异的载体蛋白来完成。参与葡萄糖同向运输的载体蛋白称为 Na^+/葡萄糖协同转运蛋白（Na^+/glucose cotransporter)。它在质膜外表面结合 2 个 Na^+和 1 分子葡萄糖，当 Na^+顺浓度梯度进入细胞时，葡萄糖就利用 Na^+电化学浓度差的势能，与 Na^+相伴随逆浓度梯度进入细胞。载体蛋白发生构象变化，失去对葡萄糖的亲和性而与之分离，载体蛋白构象恢复原状，可反复工作。Na^+浓度梯度越大，溶质进入细胞的速度越快。进入细胞的 Na^+被 Na^+-K^+-ATP 酶泵出细胞外，以保持 Na^+的跨膜浓度梯度。由此可见，这种运输所消耗的能量，实际上是由 ATP 水解间接提供的。包括小肠上皮以及其他器官（如肾）中的细胞，它们的质膜上都有类似由 Na^+电化学梯度驱动的同向运输载体蛋白，每一种载体蛋白专一地输入某一种糖或氨基酸到细胞内。小肠上皮细胞就是利用这种机制来吸收葡萄糖、果糖、甘露糖、半乳糖、氨基酸等。葡萄糖一旦进入细胞内，再以易化扩散方式通过基膜进入血流。

小肠上皮细胞顶端质膜中，存在与 Na^+耦联的 Na^+/葡萄糖协同转运蛋白，主动转运葡萄糖使胞质内产生高葡萄糖浓度；在质膜基底面和侧面，存在易化扩散转运蛋白，介导葡

萄糖易化扩散离开细胞，从而形成吸收葡萄糖的跨细胞膜定向转运途径。Na^+-K^+泵位于细胞基底面质膜上，将回流到细胞质中的Na^+转运出细胞，维持Na^+跨膜浓度梯度（图 4-23）。



●图 4-23　肠上皮细胞转运葡萄糖入血示意图

离子浓度梯度也可用来驱动对向运输。脊椎动物细胞都有Na^+驱动的对向运输载体，如Na^+-H^+交换载体（Na^+-H^+ exchange carrier）。这种载体蛋白耦联Na^+顺浓度梯度流进与H^+泵出，从而清除细胞代谢过程中产生的过多的H^+。细胞内特定的 pH 是正常代谢活动所必需的，在不分裂的细胞内 pH 为 7.1~7.2。有证据表明，大多数生长因子在刺激细胞增殖过程中激活这种对向运输，使胞内 pH 从 7.1（或 7.2）升至 7.3。Na^+-H^+交换载体的激活和引起 pH 升高在启动细胞增殖方面起重要作用，如海胆卵受精后，由于激活Na^+-H^+交换载体，pH 升高，促使卵内蛋白质与 DNA 的合成。Na^+-H^+交换载体的活性受细胞内 pH 的调节，在鸡肌细胞，当 pH 升至 7.7 以上，这种交换载体即停止活动，pH 降低时又恢复活动。

在许多有核细胞中还有一种阴离子载体，称Cl^--HCO_3^-交换器（Cl^--HCO_3^- exchanger），在调节细胞内 pH 方面起重要作用。像Na^+-H^+交换载体一样，Cl^--HCO_3^-的交换也是受细胞内 pH 调节，在 pH 升高时它的活性增加，从细胞内排出HCO_3^-，交换Cl^-进入细胞，使细胞内 pH 降低。

上述各种“主动运输”方式的特点是：①主动运输为小分子物质逆浓度或电化学梯度跨膜转运；②需要消耗量，可直接利用水解 ATP 或来自离子电化学梯度提供能量；③需要膜上特异性载体介导，这些载体蛋白不仅具有结构上的特异性（特异的结合位点），而且具有结构上的可变性（构象变化影响亲和力的改变）。细胞根据生理活动的需要，通过各种不同的方式完成各种小分子物质的跨膜转运。现将部分载体蛋白种类与功能总结于表 4-2。

表 4-2　载体蛋白

载体蛋白	位　置	能量来源	功　能
葡萄糖载体蛋白	大多数动物细胞的质膜	无	被动输入葡萄糖
Na^+ 驱动的葡萄糖泵	肾与肠上皮细胞顶部质膜	Na^+ 梯度	主动输入葡萄糖
Na^+-H^+ 交换器	动物细胞质膜	Na^+ 梯度	输出 H^+ 离子，调节细胞内 pH
Na^+-K^+ 泵（Na^+-K^+-ATP 酶）	大多数动物细胞质膜	水解 ATP	主动输出 Na^+，输入 K^+
Ca^{2+} 泵（Ca^{2+} ATP 酶）	真核细胞质膜	水解 ATP	主动运输 Ca^{2+}
H^+ 泵（H^+ ATP 酶）	动物细胞溶酶体膜	水解 ATP	从细胞质中主动输入 H^+

第三节　大分子和颗粒物质的跨膜运输

小分子物质和离子在膜转运蛋白的介导下进行跨膜运输，但膜转运蛋白不能转运大分子物质如蛋白质、多核苷酸、多糖等。事实上大多数细胞都能摄入和排出大分子物质，有些细胞甚至能吞入大的颗粒。为完成这种功能，细胞进化出一套将细胞外环境中的物质以包入物形式进行摄取的机制。大分子和颗粒物质被运输时并不直接穿过细胞膜，都是由膜包围形成膜泡，通过一系列膜囊泡的形成和融合来完成转运过程，故称为膜泡运输（vesicular transport）。细胞摄入大分子或颗粒物质的过程称为胞吞作用（endocytosis）；细胞排出大分子或颗粒物质的过程称为胞吐作用（exocytosis）。在这种形式的转运过程中涉及膜泡的融合与断裂，需要消耗能量，也属于主动转运。这种运输方式常转运较大量的大分子或颗粒物质，又称为批量运输（bulk transport）。膜泡运输不仅发生在质膜的跨膜运输中，胞内各种膜性细胞器（如内质网、高尔基复合体、溶酶体等）之间的物质运输也是以这种方式进行的。所以，膜泡运输对细胞内外物质交换、信息交流均有重要作用。本节主要介绍大分子与颗粒物质通过质膜进行的膜泡运输。

一、胞吞作用

胞吞作用又称内吞作用或入胞作用，它是质膜内陷，包围细胞外物质形成胞吞泡，脱离质膜进入细胞内的转运过程。根据胞吞物质的大小、状态及特异程度不同，可将胞吞作用分为三种类型：吞噬作用、吞饮作用及受体介导的内吞作用。

（一）吞噬作用

吞噬作用（phagocytosis）由几种特殊细胞完成。它们摄取较大的固体颗粒或分子复合物（直径>250nm），在摄入这类颗粒物质时，细胞膜凹陷或形成伪足，将颗粒包裹后摄入细胞，吞噬形成的膜泡称为吞噬体（phagosome）或吞噬泡（phagocytic）。对颗粒物质的吞入是由质膜下肌动蛋白微丝所驱动的。大多数动物细胞中，只有几种具有吞噬功能的细胞，如中性粒细胞、单核细胞及巨噬细胞等，它们广泛分布在血液和组织中，具有吞噬入侵的微生物、清除损伤和死亡的细胞等功能，在机体防御系统中发挥重要作用。病原微生物在被吞噬前，与被吞噬细胞表面的受体识别并结合。微生物一旦进入吞噬细胞内，可能被吞噬细胞中的溶酶体酶或吞噬体腔中的氧自由基杀死。

（二）胞饮作用

胞饮作用（pinocytosis）是细胞非特异地摄取细胞外液滴的过程。当细胞周围环境中某些液体物质达到一定浓度时，可通过胞饮作用被细胞吞入。胞饮作用通常发生在质膜上的特殊区域，质膜内陷形成一个小窝，包围液体物质，形成胞饮体（pinosome）或胞饮泡

（pinocytic vesicle），直径小于 150nm。根据细胞外物质是否吸附在细胞表面，将胞饮作用分为两种类型：一种是液相内吞（fluid-phase endocytosis），这是一种非特异的固有内吞作用，通过这种作用，细胞把细胞外液及其中的可溶性物质摄入细胞内。另一种是吸附内吞（absorption endocytosis），在这种胞饮作用中，细胞外大分子和（或）小颗粒物质首先以某种方式吸附在细胞表面，因此具有一定的特异性。

胞饮作用在能形成伪足或具有高度可活动膜的细胞中多见，如巨噬细胞、白细胞、毛细血管内皮细胞、肾小管上皮细胞、小肠上皮细胞等。

胞饮泡进入细胞后与内体（endosome）融合或与溶酶体融合后被降解。胞饮作用所造成质膜的损失和吞进的细胞外液，由胞吐作用补偿和平衡。

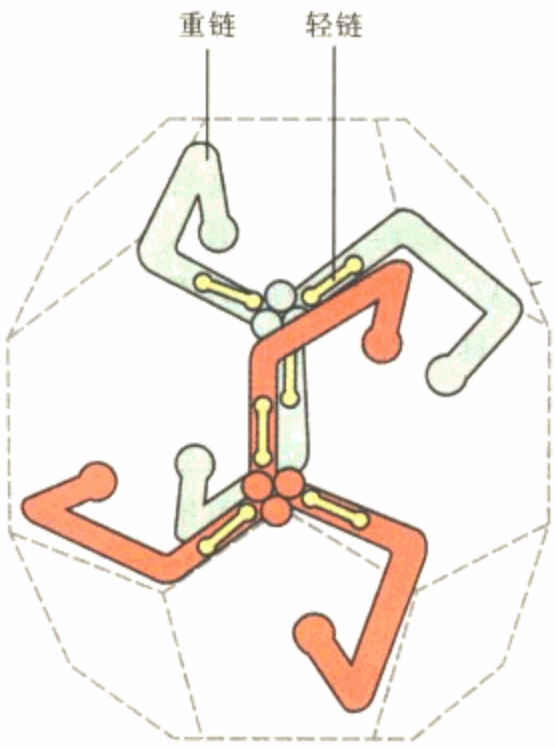
（三）受体介导的内吞作用

受体介导的内吞作用（receptor mediated endocytosis）是细胞通过受体的介导摄取细胞外专一性蛋白质或其他化合物的过程。有些大分子在细胞外液中的浓度很低，进入细胞必须先与膜上特异性受体识别并结合，然后通过膜的内陷形成囊泡，膜囊泡脱离膜而进入细胞。这种作用为细胞提供了可选择和高效地摄取细胞外大分子物质的方式，能使细胞特异地摄取细胞外含量很低的成分，而不需要摄入大量的细胞外液。与非特异的胞吞作用相比，可使特殊大分子的内化效率增加 1 000 多倍。

1. 有被小窝和有被小泡的形成　细胞膜上有多种配体（如激素、生长因子、酶和血浆蛋白等）的受体。受体集中在质膜的特定区域，称为有被小窝（coated pits）。有被小窝具有选择受体的功能，在有被小窝集中的受体的浓度是质膜其他部分的 10~20 倍。体外培养细胞中，有被小窝约占质膜表面积的 2%。电镜下有被小窝处质膜向内凹陷，直径约 50~100nm，凹陷处的质膜内表面覆盖着一层毛刺状电子致密物，其中包括网格蛋白(clathrin)和衔接蛋白（adaptor protein）。

受体介导的内吞作用，首先是细胞外溶质（配体）同有被小窝处的受体结合形成配体-受体复合物，网格蛋白聚集在有被小窝的胞质侧，有被小窝形成后进一步内陷，与质膜断离后形成有被小泡（coated vesicle）进入细胞。有被小泡的外表面包被由网格蛋白组装成的笼状篮网结构。

网格蛋白也称作笼蛋白，是一种蛋白复合物，由 3 条重链和 3 条轻链组成。重链是一种纤维蛋白，分子量为 180kD，轻链是较小的多肽，分子量为 35kD，二者组成二聚体，三个二聚体又形成了包被小泡的结构——三腿蛋白复合物（triskelion）（图 4-24）。36 个三腿蛋白复合物聚合成六角形或五角形的篮网状结构，覆盖于有被小窝（或有被小泡）的细胞质侧表面。三腿复合物网架具有自我装配的能力，体外实验发现它们在试管中能自动装配成封闭的篮网结构。网格蛋白包被有被小窝有两个作用：捕获膜上的受体使其聚集于有被小窝内；牵拉质膜向内凹陷，形成有被小泡。

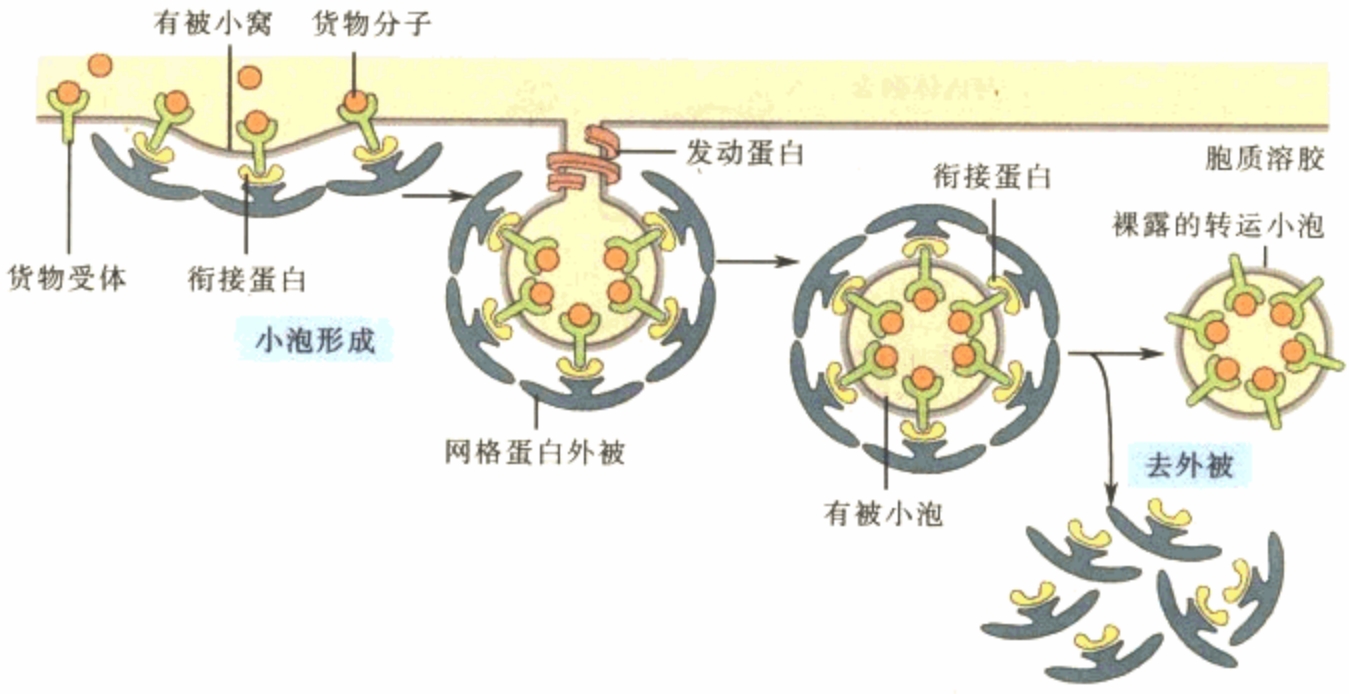


●图 4-24　三腿蛋白复合物示意图

在有被小泡的包被组成成分中，还有一种衔接蛋白，介于网格蛋白与配体-受体复合物之间，参与包被的形成并起连接作用。衔接蛋白存在不同的类型，可分别结合不同类型的受体，使细胞捕获不同类型的配体。在受体介导的内吞作用中，网格蛋白没有特异性，其特异性受衔接蛋白的调节。

当配体与膜上受体结合后，网格蛋白聚集在膜的胞质侧，通过一些六边形的网格转变成五边形的网格，促进网格蛋白外被弯曲转变成笼形结构，牵动质膜凹陷。有被小窝开始内陷并将要从

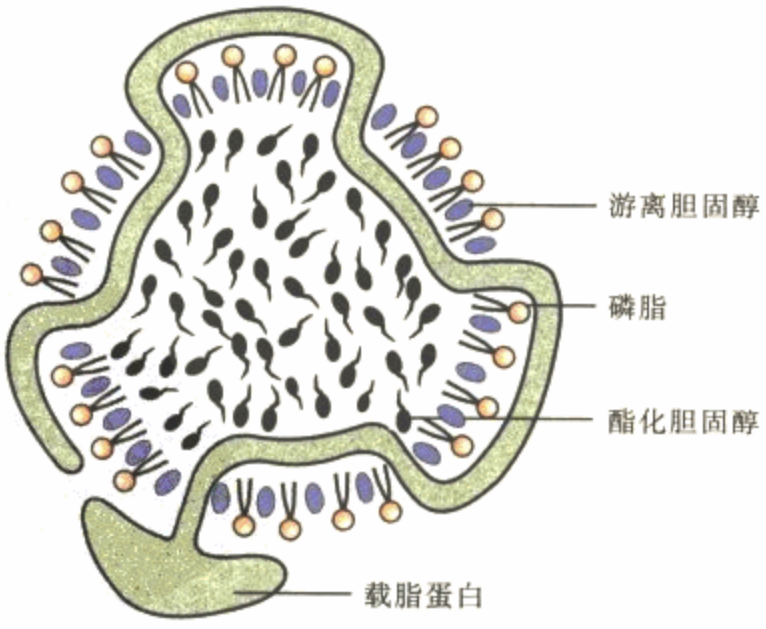
质膜上缢缩变成网格蛋白有被小泡，还需要一种小分子 GTP 结合蛋白——发动蛋白（dynamin）的参与。该蛋白自组装形成一个螺旋状的领圈结构，环绕在内陷的有被小窝的颈部，发动蛋白水解与其结合的 GTP，引起其构象改变，从而将有被小泡从质膜上切离下来，形成网格蛋白有被小泡。一旦有被小泡从质膜上脱离下来，很快脱去包被变成表面光滑的无被小泡，继而与早期内体融合。大多数情况下，早期内体的低 pH 改变了受体和配体分子的亲和状态，从而释放出与其结合的配体分子。受体与配体分离后，受体将返回质膜，开始下一轮的内吞作用（图 4-25）。



●图 4-25　有被小窝与有被小泡的形成

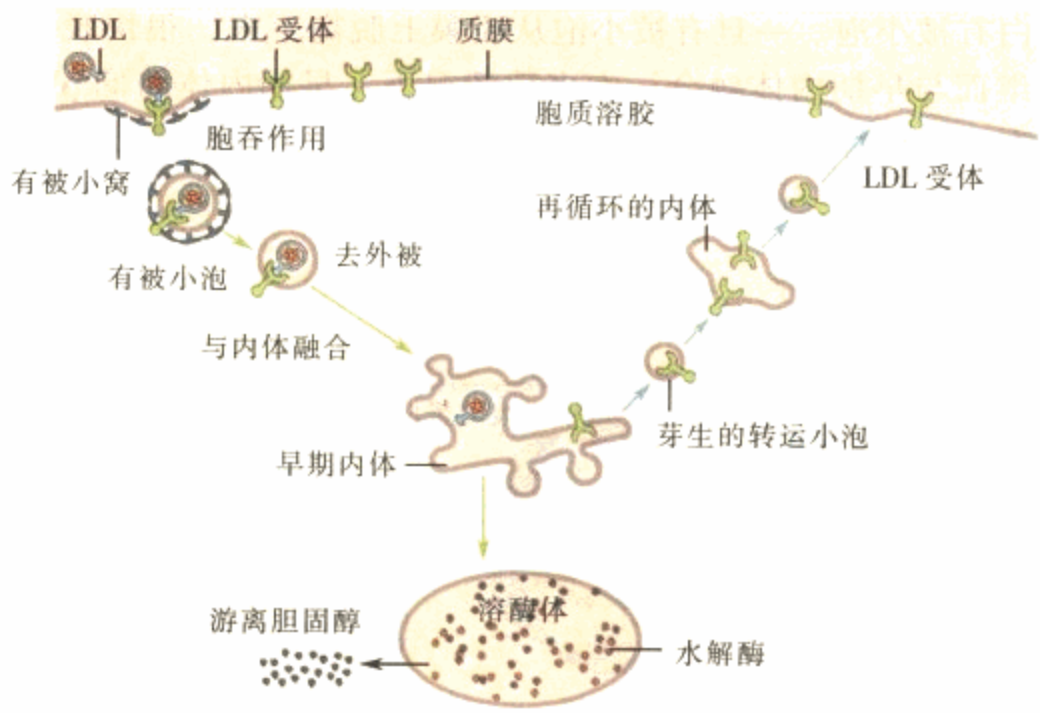
2. 受体介导的 LDL 内吞作用　大多数动物细胞的网格蛋白有被小窝和有被小泡为其摄入特定的大分子物质提供有效的途径。下面以动物细胞摄取胆固醇为例说明受体介导的内吞作用过程。胆固醇是构成膜的脂类成分，也用以合成一些类固醇激素（如肾上腺皮质激素等）。动物细胞通过受体介导的内吞作用摄入所需的大部分胆固醇。胆固醇在肝脏中合成并包装成低密度脂蛋白（low density lipoprotein，LDL）在血液中运输。LDL 为球形颗粒，分子质量为 3×10^6，直径约为 22nm。颗粒的中心含有大约 1 500 个酯化的胆固醇分子，其外包围着 800 个磷脂分子和 500 个游离的胆固醇分子。载脂蛋白 ApoB100 是细胞膜上 LDL 受体的配体，它将酯化胆固醇、磷脂、游离胆固醇组装成球形颗粒（图 4-26）。

LDL 受体是具有 839 个氨基酸残基的单次跨膜糖蛋白，C 末端的 50 个氨基酸残基伸进膜内作为胞质结构域。LDL 与有被小窝处的 LDL 受体结合，有被小窝凹陷、缢缩形成有被小泡进入细胞；有被小泡脱去外被（网格蛋白），形成无被小泡；无被小泡与内体融合，内体膜上有 H^+泵，在内体酸性环境下 LDL 与受体解离，受体经转运囊泡又返回质膜，被重新利用；LDL 被内体性溶酶体中的水解酶分解，释放出游离胆固醇。载脂蛋白被水解为氨基酸被细胞利用。当细胞需要利用胆固醇时，这些细胞就制造 LDL 受体蛋白，并把它嵌入细胞膜上，进行受体介导的内吞作用，摄入胆固醇；如果细胞内游离胆



●图 4-26　低密度脂蛋白颗粒的分子结构

固醇积累过多，细胞就停止合成胆固醇，并且停止合成 LDL 受体，这是一种反馈调节作用（图4-27）。



●图 4-27　LDL 受体介导的内吞作用

正常人每天降解 45%的 LDL，其中 2/3 经 LDL 受体途径降解，如果细胞对 LDL 的摄入过程受阻，胆固醇沉积于血液中易形成动脉粥样硬化。

动物细胞对许多重要物质的摄取都是依赖于受体介导的内吞作用，大约有 50 种以上的不同蛋白质、激素、生长因子、淋巴因子以及铁、维生素 B_{12} 等通过这种方式进入细胞。流感病毒和 HIV 病毒也是通过这种胞吞途径感染细胞的。肝细胞从肝血窦向胆小管转运 IgA 也是通过这种方式进行的。

经典实验：LDL 受体的发现

研究背景

家族性胆固醇高血症（FH）是一种常染色体显性遗传病。患者血浆胆固醇水平异常增高，可达正常值的 6~10 倍，大多数患者发生动脉粥样硬化并死于早发性心脏病。1972年开始，美国德克萨斯大学达拉斯医学院的 Michael Brown 和 Joseph Goldstein 展开了对这种疾病的研究工作。他们推断胆固醇的过量产生是由于胆固醇生物合成的调节机制发生缺陷引起的。基于这种假设，他们从正常个体和 FH 患者的皮肤分离出成纤维细胞进行培养，进行胆固醇生物合成调节的研究，并在成纤维细胞上发现了 LDL 受体。对 LDL 受体的鉴定，引发了一系列突破性实验，在随后的研究中 Brown 和 Goldstein 等揭示了受体介导的内吞途径。

实验内容

Brown 和 Goldstein 等首先检测成纤维细胞中 HMG-CoA 还原酶（胆固醇合成的限速酶）的调节作用。在正常成纤维细胞生长的培养基中加入 LDL，检测发现 HMG-CoA 还原酶活性下降，相应成纤维细胞中胆固醇合成水平也降低。而 FH 患者的成纤维细胞在加入 LDL 后，HMG-CoA 还原酶活性无改变，其活性是正常对照组成纤维细胞的 40~60 倍。实验又从细胞培养的第 6 天起，换成无 LDL 的培养基，发现正常对照组 HMG-CoA 还原酶的活性逐渐增高，细胞也合成了更多的胆固醇。相比之下，FH 患者的细胞对培

养基中 LDL 的存在与否无反应。结果表明，正常细胞通过调节 HMG-CoA 还原酶的活性（改变胆固醇的合成量）以适应环境中 LDL 浓度的改变；FH 患者细胞不能感受环境中 LDL 的量，HMG-CoA 还原酶的活性持续保持高水平。

培养基中的 LDL 为什么能够影响培养细胞的 HMG-CoA 还原酶活性？为了回答这个问题，Brown 和 Goldstein 开始研究细胞和脂蛋白之间的相互作用。他们将放射性 ^{125}I 标记的 LDL 分别加入到正常和 FH 患者的成纤维细胞培养基中，发现正常细胞与标记 LDL 的结合量随着孵育时间而增多，如果再加入额外的未标记的 LDL 则减少细胞与标记 LDL 的结合；如果加入其他的脂蛋白并不影响正常细胞与标记 LDL 的结合。这一结果表明，正常细胞结合 LDL 是 LDL 与细胞表面上有限的位点特异的相互作用，具有高度的亲和性和特异性。

与正常成纤维细胞的结果相反，FH 患者的细胞几乎没有结合 LDL 的能力。这表明正常成纤维细胞拥有特异的 LDL 受体，而 FH 患者的细胞没有这种受体或受体有缺陷。Brown 和 Goldstein 得出结论：在 FH 细胞观察到的 LDL 结合缺陷可能是 FH 的主要致病原因，外源性 LDL 不能抑制 FH 患者细胞的 HMG-CoA 还原酶，导致产生了过量的胆固醇。另有实验显示，结合到正常成纤维细胞的 LDL 与细胞膜的片段成分有关，表明 LDL 受体是一种细胞表面蛋白。

发表论文

Michael S. Brown and Joseph L. Goldstein（University of Texas Southwestern Medical School, Dallas, USA）:

Familial Hypercholesterolemia: Defective Binding of Lipoproteins to Cultured Fibroblasts Associated with Impaired Regulation of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1974, 71 : 788-792.

后续影响

随着 LDL 受体的鉴定，Brown 和 Goldstein 又证明结合到细胞表面的 LDL 迅速内化并在溶酶体中释放游离胆固醇；在与 Richard Anderson 的合作中，他们进一步证实 LDL 受体是在有被小窝处通过胞吞作用内化的。另外，他们也证明 LDL 受体在细胞内与配体解离后再循环到质膜上。实验的最初目的是研究胆固醇生物合成的调节，但最后确阐明了一条真核细胞摄入特定大分子的主要途径。LDL 受体发现后，相继发现了 VLDL 受体和清道夫受体。脂蛋白受体的发现，是脂类代谢研究的里程碑，推动了脂蛋白、载脂蛋白的深入研究。

Brown 和 Goldstein 也因为在胆固醇代谢调节方面作出的重大贡献，于 1985 年获得诺贝尔生理学与医学奖。

二、胞吐作用

胞吐作用又称外排作用或出胞作用，是与胞吞作用相反的过程，是指细胞内合成的物质通过囊泡转运至细胞膜，与质膜融合后将物质排出细胞外的过程。胞吐作用是将细胞分泌产生的酶、激素及一些未被分解的物质排出细胞外的重要方式。根据外排方式的不同，将胞吐作用分为结构性分泌途径和调节性分泌途径两种形式。

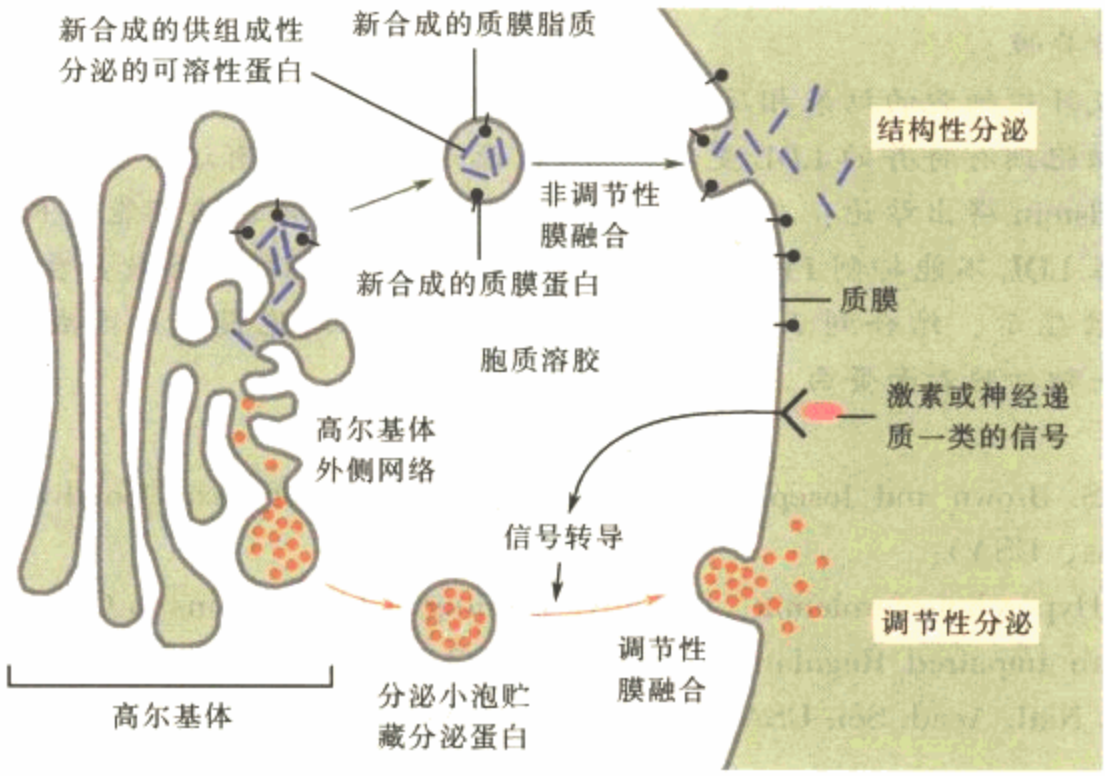
（一）结构性分泌途径

结构性分泌途径（constitutive pathway of secretion）是指分泌蛋白在粗面内质网合成之后，转运至高尔基复合体经修饰、浓缩、分选，装入分泌囊泡，随即被运送至细胞膜，与

质膜融合将分泌物排出细胞外的过程。分泌到细胞外的可溶性蛋白，有的是质膜外周蛋白，有的是细胞外基质组分，有的作为营养成分或信号分子扩散到细胞外液中。这种分泌途径普遍存在于所有动物细胞中。

（二）调节性分泌途径

调节性分泌途径（regulated pathway of secretion）是指细胞分泌蛋白合成后被储存于分泌囊泡内，只有当细胞接受到细胞外信号（如激素）的刺激，引起细胞内 Ca^{2+}浓度瞬时升高，才能启动胞吐过程，使分泌囊泡与细胞膜融合，将分泌物释放到细胞外。这种分泌途径只存在于特化的细胞中，如能分泌激素、酶、神经递质的细胞（图 4-28）。



●图 4-28　结构性分泌途径与调节性分泌途径

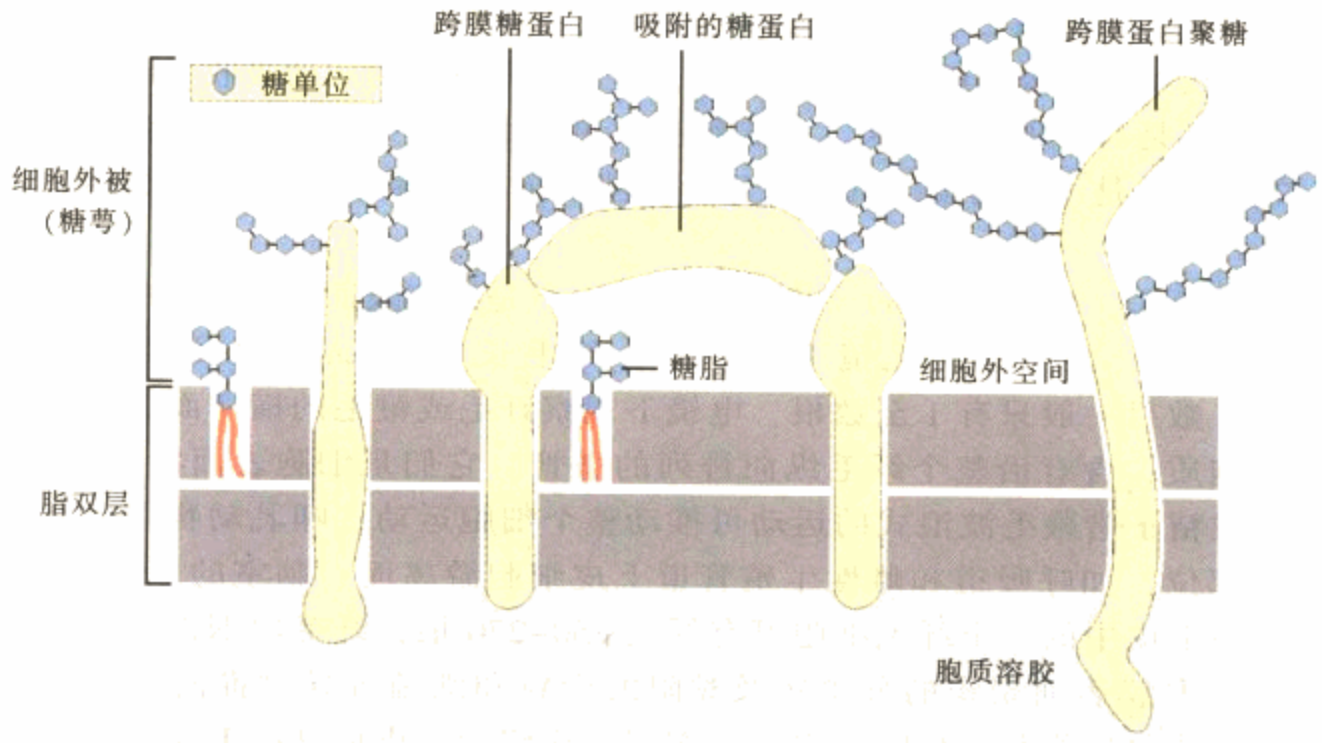
综上所述，细胞膜对物质运输有多种机制，概括起来主要有：小分子和离子的跨膜运输，又分为被动运输和主动运输两种形式；另一种是大分子和颗粒物质的膜泡运输（transport by vesicle formation），又分为胞吞作用和胞吐作用。

第四节　细胞表面及其特化结构

细胞表面（cell surface）是指包围在细胞质外层的一个结构复合体系和多功能体系。多细胞生物体中的大多数细胞表面是同它的相邻细胞或细胞外基质联系在一起的，是细胞与外界环境相互作用、并产生各种复杂功能的部位。其结构以质膜为主体，包括质膜外的细胞外被（cell coat）和质膜内侧的胞质溶胶（cytosol）（图 4-29）。广义的细胞表面还包括细胞连接和一些特化结构。

一、细胞外被和胞质溶胶

在大多数真核细胞表面有富含糖类的周缘区，被称为细胞外被（cell coat）或糖萼（glycocalyx）。用重金属染料如钌红染色后，在电镜下可显示厚约 10~20nm 的结构，边界不甚明确。细胞外被中的糖类主要包括与糖蛋白和糖脂相连的低聚糖侧链，但同时也包括被分泌出来又吸附于细胞表面的糖蛋白与蛋白聚糖的多糖侧链。这些吸附的大分子是细胞



●图 4-29　细胞表面结构示意图

外基质的成分，所以细胞膜的边缘与细胞外基质的界限是难于区分的。

现在细胞外被一般用来指与质膜相连接的糖类物质，即质膜中的糖蛋白和糖脂向外表面延伸出的寡糖链部分，而把不与质膜相连接的细胞外覆盖物称为细胞外物质或胞外结构。因此，细胞外被实质上是质膜结构的一部分。

细胞外被的基本功能是保护作用，如消化道、呼吸道等上皮细胞的细胞外被有助于润滑、防止机械损伤，同时又可保护黏膜上皮不受消化酶的作用等。近年来研究资料表明，细胞外被在细胞的生命活动中具有重要作用。如决定细胞的识别，细胞识别与质膜糖蛋白和糖脂伸出的寡糖链密切相关。每种细胞寡糖链的单糖残基具有一定的排列顺序，编成了细胞表面的密码，它是细胞的“指纹”，同时细胞表面尚有寡糖的专一受体，对具有一定序列的寡糖链具有识别作用，因此，细胞识别实质上是分子识别。另外，细胞外被还参与细胞的物质运输、接触抑制、形态形成与分化等过程，并且与免疫识别、癌变都有十分密切的关系。

胞质溶胶为在质膜下面一层厚约 0.1~0.2μm 的较黏滞无结构的液体物质，也称为溶胶层。其中含有较高浓度的蛋白质，分布着较多的微丝和微管，而缺少其他细胞器。微丝、微管与膜蛋白直接或间接相连，在结构和功能上可视为一个整体，这部分具有较高的抗张强度，对维持细胞形态、极性及运动都有重要作用。

二、细胞表面的特化结构

细胞表面并不是光滑平整的，细胞膜常与膜下的细胞骨架系统相互联系，协同作用，形成细胞表面的一些特化结构。这些特化结构包括微绒毛、纤毛和鞭毛等，还包括细胞的一些暂时的结构，如褶皱、变形足等。

1. 微绒毛　微绒毛（microvillus）是细胞膜和细胞质共同突向腔面的细小指状突起，在电镜下才能辨认。其直径约为 0.1μm，长约 0.2~1.0μm。微绒毛表面是质膜和糖被，内部是细胞质的延伸部分，其中心有许多纵形排列的微丝直达微绒毛的顶端。有些细胞的微绒毛较少，长短不等，而肠黏膜上皮中的吸收细胞和肾近曲小管上皮细胞游离面有大量密集整齐排列的微绒毛。如小肠上皮中的吸收细胞约有 1 000~3 000 根微绒毛，微绒毛表面

的细胞外被中含有磷脂酶、双糖酶及氨基肽酶等，有助于食物的分解和吸收。微绒毛的存在，扩大了上皮细胞吸收表面积约 20~30 倍，有利于对营养物质的吸收。细胞表面存在的微绒毛，并不都是与吸收功能有关。游走细胞（单核细胞、中性粒细胞、淋巴细胞及巨噬细胞等）的微绒毛是细胞运动工具，并且参与搜索抗原、毒素及协助摄取异物（如病毒、细菌等）。

2. 纤毛和鞭毛　纤毛（cillia）和鞭毛（flagella）是细胞表面向外伸出的细长突起。比微绒毛粗而且长，能摆动，光镜下能看见。纤毛长 5~10μm，数目很多。鞭毛长约 150μm 左右，数目一般只有 1 至数根。电镜下观察纤毛或鞭毛的横切面，表面围以细胞膜，内为细胞质，含有沿整个纤毛纵向排列的微管。它们是细胞表面特化的运动结构，如原生动物或精子借鞭毛波浪式的运动可推动整个细胞运动；哺乳动物中，纤毛出现在一些特定的部位，如呼吸道和雌性生殖管道上皮细胞游离面、脑室的室管膜细胞等处。上呼吸道黏膜上皮中的一个纤毛细胞可有纤毛 250~270 根，纤毛向咽部定向有节律的摆动，将呼吸道黏膜表面聚积的分泌物及黏附的尘粒和细菌等异物推向咽部，然后被咳出。纤毛具有清除异物和净化吸入空气的作用。输卵管上皮借助纤毛摆动可将受精卵送至子宫。

3. 褶皱　褶皱（ruffle）或片状伪足（lamellipodium）是细胞表面的临时性扁状突起。它不同于微绒毛，宽而扁，宽度不等，厚度约 0.1μm 与微绒毛直径相当，高达几微米。褶皱在活动细胞的边缘比较显著，其外缘常常展现波形运动，使它呈皱褶状。圆形的白细胞质膜接受到来自身体损伤部位的一个化学信号，便诱发局域的肌动蛋白聚合，使白细胞在这个方向上形成片状伪足而产生趋化运动。巨噬细胞表面普遍存在着褶皱，与吞噬颗粒物质有关，因此，褶皱是细胞的吞饮装置。

第五节　细胞膜异常与疾病

细胞膜是细胞与环境间的界膜，是维持细胞内环境稳定，调节细胞正常生命活动的重要结构。细胞膜在细胞内外物质运输、信息传递、细胞识别和代谢调节等各种生命活动中都起重要作用。因此，膜结构任何成分的改变和功能异常，都会导致细胞发生病理改变，甚至机体功能紊乱，引起疾病的发生。

细胞膜中存在许多与物质跨膜运输有关的转运蛋白（载体蛋白、通道蛋白、离子泵等），如果这些蛋白功能异常，必将引起物质转运障碍而引发疾病。转运蛋白是由基因编码的，由于基因突变或表达异常引起转运蛋白数目异常或结构缺陷是引起相应遗传性膜转运异常疾病的原因。

一、载体蛋白异常与疾病

1. 胱氨酸尿症　胱氨酸尿症（cystinuria）是一种遗传性膜转运异常疾病，是由病人肾小管上皮细胞转运胱氨酸及二氨基氨基酸（赖氨酸、精氨酸及鸟氨酸）的载体蛋白缺陷引起的疾病。病人肾小管上皮细胞的胱氨酸载体蛋白异常对肾小球滤出的原尿中四种氨基酸重吸收发生障碍，尿中四种氨基酸排出过量，致使病人血液中这些氨基酸水平低于正常值，而尿中这些氨基酸水平增高。因为这四种氨基酸中赖氨酸、精氨酸和鸟氨酸均易溶于水，而胱氨酸不易溶于水（在 pH5~7 时尿中胱氨酸饱和浓度为 0.3~0.4g/L），当病人每日排尿量中胱氨酸达 0.5~1.0g 时，超过其饱和浓度，胱氨酸就从尿中析出结晶，形成尿路结石，引起肾损伤；同时这种病人小肠黏膜上皮细胞的主动转运机制可能也有类

似缺陷，但这种吸收和转运缺陷一般不造成营养不良，而是以肾结石引起的肾功能损伤为主。

2. 肾性糖尿　肾性糖尿（renal glycosuria）是肾小管上皮细胞葡萄糖重吸收障碍，在血糖正常情况下尿中出现葡萄糖。正常情况下葡萄糖经肾小球滤出后，绝大部分在近端肾小管经钠驱动葡萄糖载体被重吸收。本病是由于病人肾小管上皮细胞膜转运葡萄糖的载体蛋白功能缺陷，致使葡萄糖的重吸收障碍引起糖尿。正常人在近端肾小管重吸收葡萄糖的最大吸收量是 250~335mg/min，而当这种重吸收功能降低时葡萄糖重吸收减少，就会出现肾性糖尿。

二、离子通道异常与疾病

目前已发现一些严重的遗传性疾病是由编码离子通道蛋白的相关基因突变所引起的。其中囊性纤维化（cystic fibrosis，CF）是目前研究得最清楚而又常见的遗传性离子通道异常疾病。CF 是白种人中最常见的致死性常染色体隐性遗传病。由于大量黏液阻塞全身外分泌腺所致慢性阻塞性肺疾病和胰腺功能不全，CF 临床主要表现为慢性咳嗽、大量黏痰及反复发作的难治性肺部感染、长期慢性腹泻、吸收不良综合征、生长发育迟缓等。在高加索人群中，大约每 2 500 个婴儿中就有 1 个发生先天性囊性纤维化，在北欧，致病基因携带者比例为 1/25。CF 患者在东方人中罕见。

引起 CF 的相关基因定位于染色体 7q31，命名为囊性纤维跨膜转导调节子（CFTR）。目前已知 CFTR 是位于细胞质膜上一个受 cAMP 调节的氯离子通道。在 cAMP 介导下，CFTR 发生磷酸化，引起通道开放，每分钟向胞外转运约 10^6 个 Cl^-。70% CF 患者的 *CFTR* 基因出现相同的遗传变化，他们的 DNA 都缺失编码 508 位苯丙氨酸的 3 个碱基对。缺乏 508 位苯丙氨酸的 CFTR 多肽不能在内质网中正常加工，不能到达上皮细胞质膜表面。因此，这种 CF 患者的质膜上完全缺失 CFTR 离子通道，这些患者的病情非常严重。有些 CFTR 蛋白能到达细胞表面，但出现结构异常。CFTR 异常导致细胞向外转运 Cl^-减少，Cl^-和水将不能进入呼吸道分泌的黏液中去，分泌的黏液水化不足黏度增大，造成纤毛摆动困难，不能向外排除分泌物而易于引发细菌感染。胆管、肠及胰腺细胞也存在类似的机制，因而产生相应的临床症状。CF 患者肺部感染蓝绿假单胞杆菌最普遍，危害也最严重。现将一些通道蛋白异常引起的严重遗传性疾病总结于表 4-3。

表 4-3　通道蛋白异常引起的遗传性疾病

遗传性疾病	通道类型	基因	临床症状
家族性半身不遂的偏头痛（FHM）	Ca^{2+}	*CACNL1A4*	偏头痛
发作性共济失调症-2（EA-2）	Ca^{2+}	*CACNL1A4*	运动失调（缺乏平衡协调能力）
先天性低血钾周期性麻痹症	Ca^{2+}	*CACNL1A3*	周期性肌强直（肌肉僵硬）和麻痹
发作性共济失调症-1	K^+	*KCNA1*	运动失调
良性家族性新生儿惊厥	K^+	*KCNQ2*	癫痫样惊厥
非综合征的显性耳聋	K^+	*KCNQ4*	耳聋
长 QT 综合征	K^+	*HERG*	头晕目眩，心室纤颤
	Na^+	*KVLATI* 或 *SCN5A*	导致猝死
高血钾周期性麻痹症	Na^+	*SCN4A*	周期性肌强直和麻痹
Liddle 综合征	Na^+	*β-ENaC*	高血压
重症肌无力	Na^+	*nAChR*	肌肉无力
Dent 氏病	Cl^-	*CLCN5*	肾结石

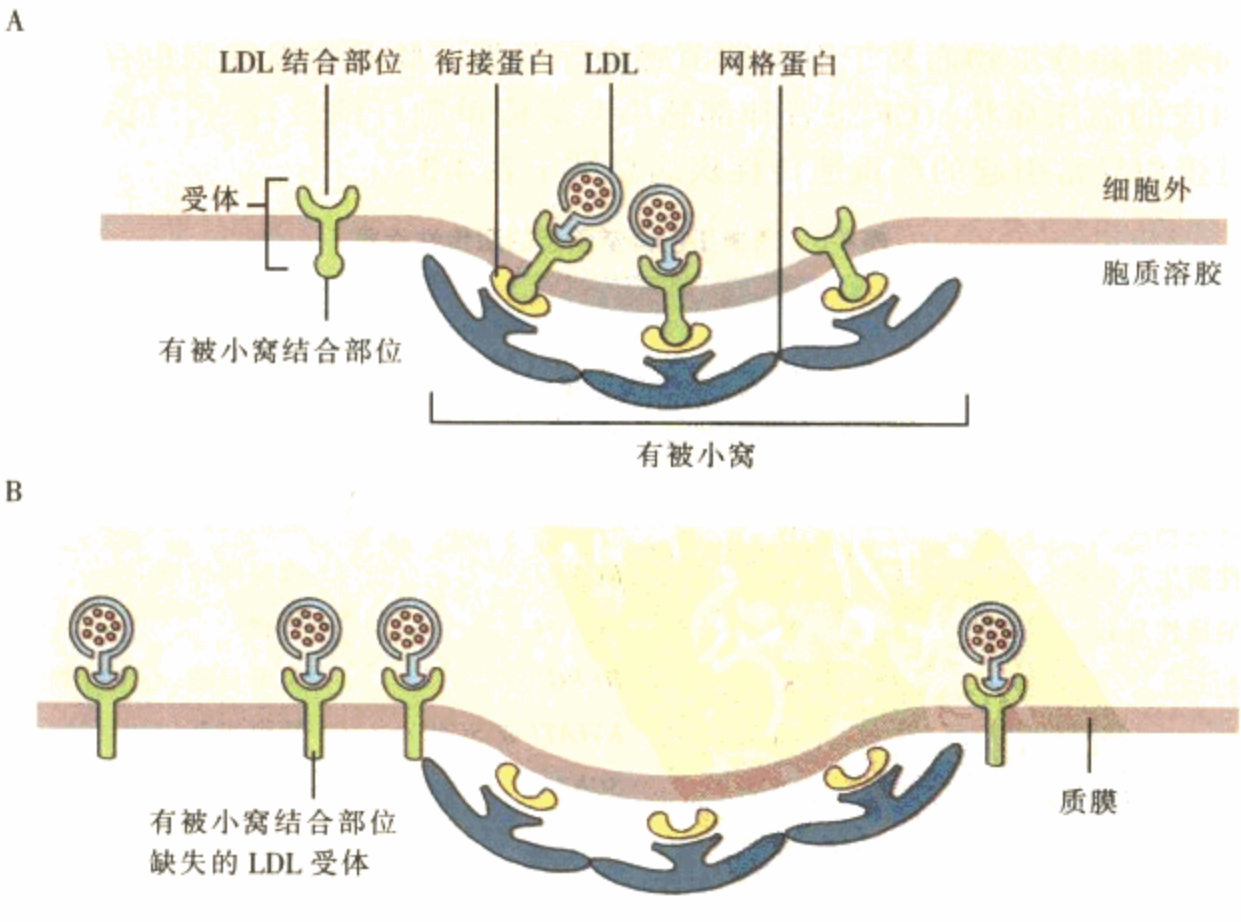
续表

遗传性疾病	通道类型	基因	临 床 症 状
先天性肌强直	Cl^-	*CLC-1*	周期性肌强直
细胞囊性纤维化	Cl^-	*CFTR*	肺充血和感染
心脏心律失常	Na^+	许多不同的基因	不规则或加速的心跳
	K^+		
	Ca^{2+}		

三、膜受体异常与疾病

细胞膜受体除在信号转导过程中起重要作用外，有些细胞膜受体在跨膜物质转运中也是不可缺少的，特别是在介导某些生物大分子的内吞作用，即所谓受体介导的内吞作用。膜受体异常会引起被转运物质积累，引起疾病发生。

1. 家族性高胆固醇血症　家族性高胆固醇血症（familial hypercholesterolemia）是一种常染色体显性遗传病，患者编码 LDL 受体的基因发生突变，导致 LDL 受体异常。由于细胞不能摄取 LDL 颗粒，引起血液中胆固醇浓度升高并在血液中沉积，患者会过早地发生动脉粥样硬化和冠心病。LDL 受体异常主要包括受体缺乏或受体结构异常，前者是指受体数目缺少，后者是受体结构有缺陷。有的病人合成的 LDL 受体数目缺少，如重型纯合子病人 LDL 受体只有正常人的 3.6%，他们的血液中胆固醇含量比正常人高 6~10 倍，常在 20 岁前后出现动脉硬化，死于冠心病。轻型杂合子病人受体数目只有正常人的 1/2，可能在 40 岁前后发生动脉硬化，冠心病。也有一些病人 LDL 受体数目正常，但 LDL 受体结构异常，受体与 LDL 结合部位有缺陷，不能与 LDL 结合，或者受体与有被小窝结合部位缺失，不能被固定在有被小窝处，如受体胞质结构域中 807 位正常的酪氨酸被半胱氨酸替代，这种单个氨基酸序列的改变使受体失去了定位于有被小窝的能力。这些都会造成 LDL 受体介导的内吞作用障碍，出现持续的高胆固醇血症（图 4-30）。



●图 4-30　细胞膜上 LDL 缺陷受体示意图

2. 重症肌无力症　重症肌无力（myasthenia gravis）是一种自身免疫性疾病，也是一种受体异常的疾病。患者并不缺少 N 型乙酰胆碱受体（N-Ach），但是产生了抗 N-Ach 的抗体。此抗体与神经—肌接头处突触后膜上的受体结合，使乙酰胆碱不能与受体结合，从而封闭了乙酰胆碱的作用，引起重症肌无力症。

抗 N-Ach 的抗体阻断受体的效应机制可能有三种情况：抗体与受体结合，占据了受体的位置，从而阻断了与配体结合，封闭了配体的作用；抗体与受体结合后引起细胞内吞受体，使受体数目减少；抗体与受体结合能激活补体，使运动终板破坏，导致受体脱落。

小结

细胞膜是围绕在细胞表面的一层薄膜，是细胞与外界环境进行物质交换的屏障，维持着细胞内环境的稳定，调节细胞正常生命活动。此外，细胞膜还行使着细胞识别、信号转导和细胞连接等多种复杂的功能。

不同类型的细胞中，细胞膜的化学组成基本相同，主要由脂类、蛋白质和糖类组成。膜脂主要包括磷脂、胆固醇和糖脂。磷脂是最重要的脂质，磷脂分子具有一个亲水的极性头和两个非极性尾，在水溶液中能自动形成脂双分子层，构成膜的基本骨架。胆固醇分子较小，散布在磷脂分子之间，能调节膜的流动性和稳定性。细胞膜是由脂双分子层和以不同方式与其结合的蛋白质构成的生物大分子体系。膜的重要功能主要由膜蛋白完成，可分为内在膜蛋白、外在膜蛋白和脂锚定蛋白，不同细胞中其含量及类型有很大差异。膜糖类与脂分子和蛋白结合，分布于质膜的外侧面，参与细胞与环境的相互作用。细胞膜的主要特性是不对称性和流动性。膜脂、膜蛋白及膜糖的类型和数量在膜的两侧或同一侧的不对称分布保证了生命活动的高度有序性。膜的流动性包括膜脂的流动性和膜蛋白的运动性。膜脂及膜蛋白的分布影响膜的流动性。生物膜是一个动态的结构，膜的各种功能的完成均是在膜的流动状态下进行的。

细胞膜主要的结构模型有片层结构模型、单位膜模型、流动镶嵌模型、脂筏模型等。流动镶嵌模型目前被广泛接受，认为细胞膜是嵌有球形蛋白质的脂类二维流体，强调了膜的流动性和不对称性，较好地解释了细胞膜的结构和功能特点。脂筏模型指脂双层含有由特殊脂质和蛋白质组成的微区，有序且较少流动，参与信号转导、受体介导的内吞作用以及胆固醇运输等。

物质跨膜运输是细胞膜的基本功能，分为被动运输和主动运输。被动运输包括简单扩散和易化扩散，从高浓度向低浓度方向运输，动力来自浓度梯度，不需提供能量。膜转运蛋白分为载体蛋白和通道蛋白，前者介导被动运输和主动运输，后者只介导被动运输。每种载体蛋白能与特定的溶质分子结合，通过构象改变介导溶质分子跨膜运输。通道蛋白形成亲水的跨膜通道，允许适宜大小的分子和带电荷离子通过。通常根据通道门控机制模式和所通透离子的种类分为：配体门控通道、电压门控通道和应力激活通道等。

主动运输是由载体蛋白通过各种不同的方式，介导各类小分子物质逆浓度梯度或电化学梯度由低向高进行的跨膜转运，需要与某种释放能量的过程相耦联。Na^+-K^+泵是一个多次跨膜的膜整合蛋白，具有 ATP 酶活性。动物细胞借助 Na^+-K^+泵维持细胞渗透平衡和膜电位，为物质的吸收提供驱动力并给蛋白质合成及代谢活动提供必要的离子浓度等。Ca^{2+}泵也是由 ATP 直接提供能量，以维持细胞内外的 Ca^{2+}浓度梯度。协同运输是由 Na^+-K^+泵与载体蛋白协同作用，依靠间接消耗 ATP 形成离子梯度，完成物质的跨膜转运。根据溶质分子转运的方向和离子浓度梯度的方向，协调运输可分为同向运输和对向运输。

动物细胞通过胞吞作用和胞吐作用进行大分子与颗粒物质的膜泡运输。胞吞作用又分

吞噬作用和胞饮作用。大多数细胞都能通过胞饮作用非特异地吞入胞外溶液和一些大分子。吞噬作用则是由几种特化的吞噬细胞摄入大的固体颗粒物质或大分子复合物。受体介导的内吞作用是细胞通过受体的介导特异地摄取胞外物质的一种高效的途径。某些特定的生物大分子同膜上特异性受体形成配体-受体复合物，网格蛋白通过衔接蛋白与受体相连并弯曲转变成笼形结构，牵动质膜凹陷形成有被小窝，小 GTP 结合蛋白装配到有被小窝颈部，使有被小窝从质膜上缢缩断离形成有被小泡进入细胞后，脱去包被变成无被小泡。动物细胞摄取 LDL 即是典型的受体介导的内吞作用。胞吐作用是囊泡将细胞合成的物质转运至细胞膜，与质膜融合排出物质的过程。包括结构性分泌途径和调节性分泌途径。胞吞作用和胞吐作用都是通过囊泡运输方式进行的，这种动态过程对质膜更新和维持细胞的生存与生长都非常必要。

细胞表面是指包围在细胞质外层的一个结构复合体系和多功能体系，包括细胞外被和胞质溶胶。细胞外被是细胞表面有富含糖类的周缘区，基本功能是保护作用，另外，细胞外被还参与细胞的物质运输、接触抑制、形态形成与分化等过程。

细胞膜结构与功能改变和异常，会导致细胞发生病理变化，甚至引起机体功能紊乱。如载体蛋白异常、离子通道缺陷、膜受体异常会引起物质转运发生障碍，引发疾病。研究细胞膜在各种疾病中的变化，对探讨疾病的发生、发展、诊断和治疗具有重要的意义。

（徐　晋）

第五章　细胞的内膜系统与囊泡转运

内膜系统（endomembrane system），是细胞内那些在结构、功能及其发生上相互密切关联的膜性结构细胞器之总称。主要包括：内质网、高尔基复合体、溶酶体、各种转运小泡以及核膜等功能结构。除此之外，还有过氧化物酶体。过氧化物酶体是否属于或可归纳到内膜系统，也有人提出了不同看法。但是，为了讲述的方便，我们依然按照多数学者的习惯划分，将该结构放在本章中一并加以介绍和讨论。

内膜系统的出现，不仅是真核细胞与原核细胞之间在形态、结构上相互区别的重要标志之一，而且也被认为是细胞在其漫长的历史演化进程中，内部结构不断分化完善，各种生理功能逐渐提高的结果。由之所产生、形成的区域性房室（compartment）化作用，使胞内不同的生理、生化反应过程得以彼此独立、互不干扰地在特定的区域内进行和完成，并有效地增大了细胞内有限空间的表面积，从而极大地提高了细胞整体的代谢水平和功能效率。

第一节　内　质　网

早在19世纪末，C. Garnier在对动物体内具有旺盛分泌活动的唾液腺和胰腺等组织细胞进行光镜观察时就注意到：该类细胞中存在一个呈现为丝条状形态结构的嗜碱性特化区域。这些丝条状的结构，随着动物的生理及细胞活动状态的不同而处于一种动态的变化过程。亦即，当动物严重饥饿或细胞中形成大量酶原颗粒后，丝条状结构减少，甚至消失；当动物进食后或细胞进行活跃的分泌活动时，它又会重新出现。据此，Garnier将此种结构称之为动质（ergastoplasm），并推测，其可能与消化液的合成、分泌有关。

1945年，K. R. Porter等人通过对动质的电镜观察首次发现：光镜下呈现丝条状的动质结构，实际上是聚集、分布于细胞核附近内质区的一些由小泡、小管相互吻合，彼此连接形成的网状结构。他们根据动质这种特殊的胞内区域分布和电镜结构特征，遂将之易名为内质网（endoplasmic reticulum，ER），并被沿用至今。

1954年，Porter和G. E. Palade等的研究证实：内质网是一类由大小、形态各异的膜性囊泡所构成的细胞器；此后更多的观察研究资料进一步表明，内质网并非仅仅分布于内质区，而且常常扩展、延伸至靠近细胞膜的外质区；它不仅普遍地存在于几乎所有动物的不同组织细胞类型，同时也常见于各种植物的绝大多数组织细胞之中。

20世纪60年代以前，对内质网的研究主要着重于其在细胞内的分布状况及形态结构方面。之后，由于同位素标记示踪放射自显影技术、电镜细胞化学和免疫细胞化学等技术的应用，使得对于内质网的功能及与之相关的大分子定位等也有了较为全面的了解。

一、内质网的化学组成

内质网通常可占到细胞全部膜相结构组成的50%左右；占细胞总体积的10%以上；相当于整个细胞质量的15%~20%。应用超速分级分离的方法，可从细胞匀浆中分离出直径在100nm左右的球囊状封闭小泡，人们称之为微粒体（microsome）。生化分析及体外实验证明：微粒体不仅包含有内质网膜与核糖体两种基本组分，而且可行使内质网的一些

基本功能。由此推断：微粒体系由细胞匀浆过程中被破损了的内质网所形成。目前，对内质网的化学特征与生理功能的了解和认识，大多是通过对微粒体的生化、生理分析而获得的。

同细胞膜等其他膜相结构一样，内质网膜也以脂类和蛋白质为其结构的主要化学组成成分。综合不同动物组织细胞来源的微粒体分析资料显示，内质网膜脂类与蛋白质的组成比例大约为 1∶2。在此仅以大鼠肝细胞和胰腺细胞来源的微粒体为例，来说明内质网膜的脂类和蛋白质组成情况：

内质网膜的类脂双分子层组成包括磷脂、中性脂、缩醛脂和神经节苷脂等。其中以磷脂含量最多。不同磷脂的百分比含量大致为：卵磷脂 55%左右；磷脂酰乙醇胺 20%~25%；磷脂酰肌醇 5%~10%；磷脂酰丝氨酸 5%~10%；鞘磷脂 4%~7%。

内质网膜含有的蛋白质及酶类是非常复杂、多样的。在对大鼠肝细胞与胰腺细胞内质网膜蛋白质进行的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分析研究中，可分别观察到 33 条和 30 条不同的多肽带纹；它们的相对分子质量大小从 15~150kD 不等。

内质网膜中含有的酶蛋白至少在 30 种以上。根据它们的功能特性，大致可划分为以下几种类型：

第一种类型：是与解毒功能相关的氧化反应电子传递酶系。主要由细胞色素 P450、NADPH-细胞色素 P-450 还原酶、细胞色素 b_5、NADH-细胞色素 b_5 还原酶和 NADH-细胞色素 c 还原酶等组成；

第二种类型：是与脂类物质代谢功能反应相关的酶类。如脂肪酸 CoA 连接酶、磷脂醛磷酸酶、胆固醇羟基化酶、转磷酸胆碱酶及磷脂转位酶等；

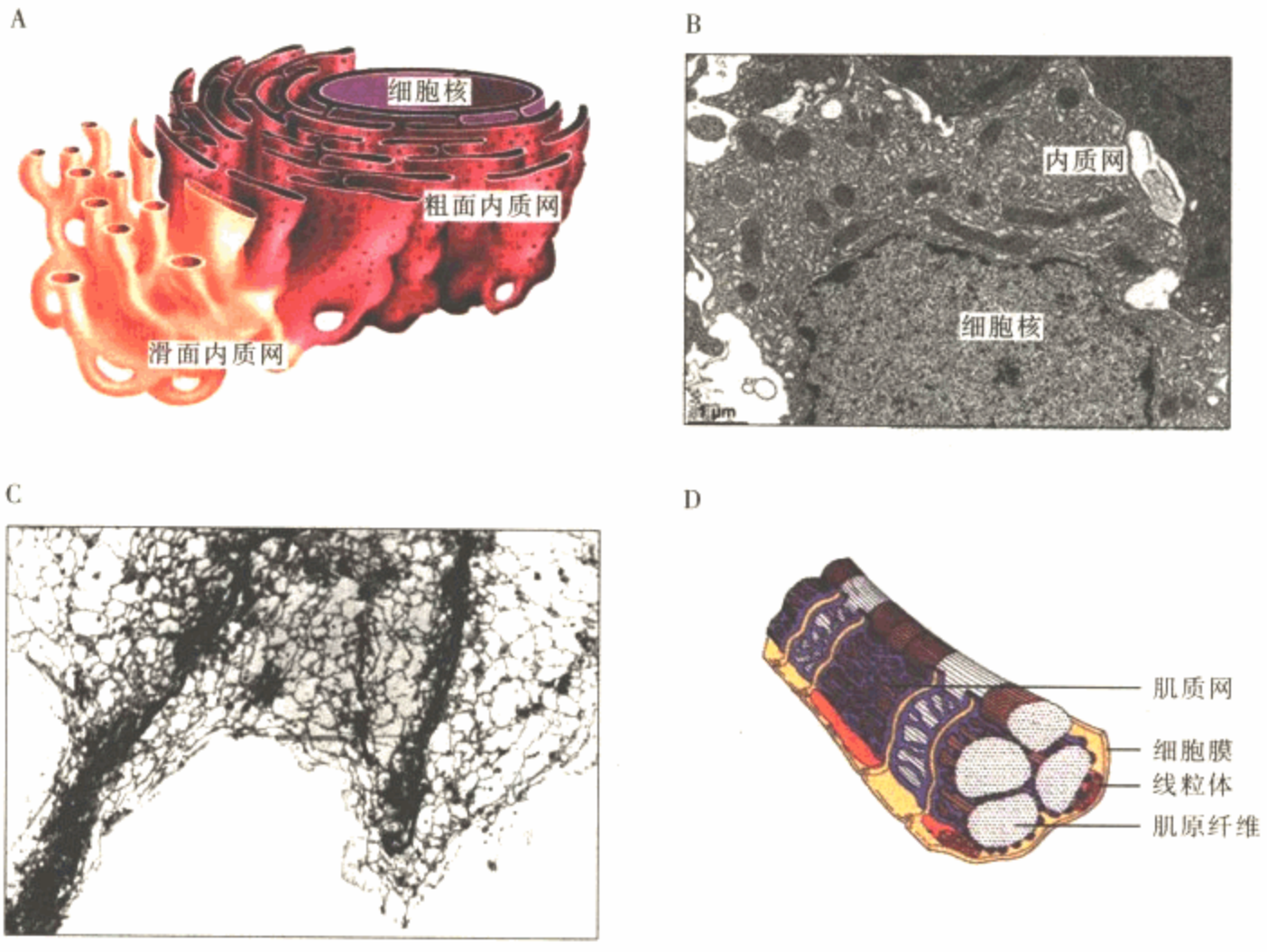
第三种类型：是与碳水化合物代谢功能反应相关的酶类。主要包括葡萄糖-6-磷酸酶、β-葡萄糖醛酸酶、葡萄糖醛酸转移酶和 GDP-甘露糖基转移酶等。葡萄糖-6-磷酸酶被视为内质网的主要标志性酶。

此外尚有参与蛋白质加工转运的多种酶类。

二、内质网的形态结构

内质网以平均膜厚度约 5~6nm 的小管（ER tubule）、小泡（ER vesicle）或扁囊（ER lamina）为其基本“结构单位”（unit structure）。这些大小不同、形态各异的膜性管、泡和扁囊，在细胞质中彼此相互连通，构成了一个连续的膜性三维管网结构系统。在整体结构上，可与高尔基复合体、溶酶体等内膜系统的其他组分移行转换；在功能上则与这些结构密切相关。内质网还可向内延伸，与细胞核外膜直接连通。因而，有人认为：核膜是在间期细胞中包裹核物质的内质网的一部分。

在不同的组织细胞中，或同一种细胞的不同发育阶段以及不同生理功能状态下，内质网往往会呈现出其形态结构、数量分布和发达程度的差别。例如，大鼠肝脏细胞中的内质网主要是由一组扁平囊泡（5~10 个）层叠排列，并通过它们边缘的小管相互连通而成。这些扁囊的表面附着有很多核糖体颗粒，在连通扁囊的小管周围，经常可见散在的小泡结构（图 5-1A）。在睾丸间质细胞中的内质网则由众多的分支小管或小泡构筑呈网状结构形式（图 5-1B）。我国学者宋今丹应用整装细胞电镜技术，在培养的猴肾上皮细胞中观察到内质网的全貌性结构与分布：内质网以细胞核为中心向周围铺展，细胞核周围的内质网较稠密并形成复杂的立体构筑，远离细胞核的内质网较稀疏，内质网可延伸至细胞边缘乃至细胞突起中（图 5-1C）。横纹肌细胞中的肌质网（sarcoplasmic reticu-



●图 5-1　内质网的形态结构

A. 内质网立体形态结构模式图　B. 内质网电镜图　C. 经高锰酸钾技术处理后的细胞在透射电镜下的内质网结构（中国医科大学宋今丹提供）　D. 横纹肌肌质网立体结构模式图

lum）是内质网的又一种形态结构存在形式，其在每一个肌原纤维节中连成一网状单位（图 5-1D）。

一般而言，在不同种生物的同类组织细胞中，它们的内质网基本是相似的。然而，在同一组织细胞中，内质网的数量及结构的复杂程度，则往往与细胞的发育进程成正相关。亦即，与细胞的生长发育相伴，内质网的数量、结构也在逐渐地发生着从少到多、从简单到复杂、从单管少囊的稀疏网状到复管多囊的密集网状的变化。

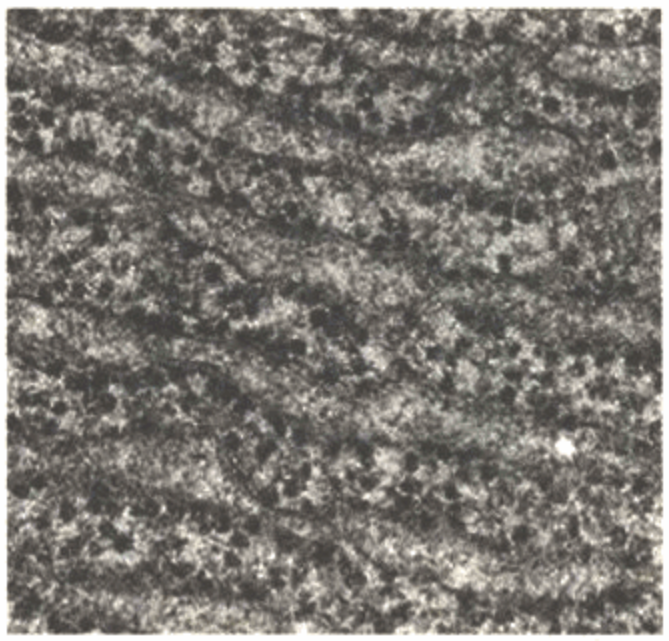
三、内质网的基本类型

根据电子显微镜观察的资料，通常把内质网划分为两种基本类型，即所谓的粗面内质网（rough endoplasmic reticulum，RER）和滑面内质网（smooth endoplasmic reticulum，SER）。此外，在某些特殊的正常细胞类型或发生了某种病变的细胞中，内质网也可呈现出其他的结构形态。

（一）粗面内质网的主要形态特征是表面有核糖体附着

粗面内质网又称颗粒内质网（granular endoplasmic reticulum，GER），以其网膜胞质面有核糖体颗粒的附着为主要形态特征，并因此而得名。

在结构形态上，粗面内质网多呈排列较为整齐的扁平囊状（图 5-2）；在功能上，粗面内质网主要和外输性蛋白质及多种膜蛋白的合成、加工及转运有关。因此，在具有肽类激素或蛋白分泌功能的细胞中，粗面内质网高度发达；而在肿瘤细胞和未分化细胞中则相对少见。



●图 5-2　粗面内质网透射电镜图

（二）滑面内质网呈表面光滑的管、泡样网状形态结构

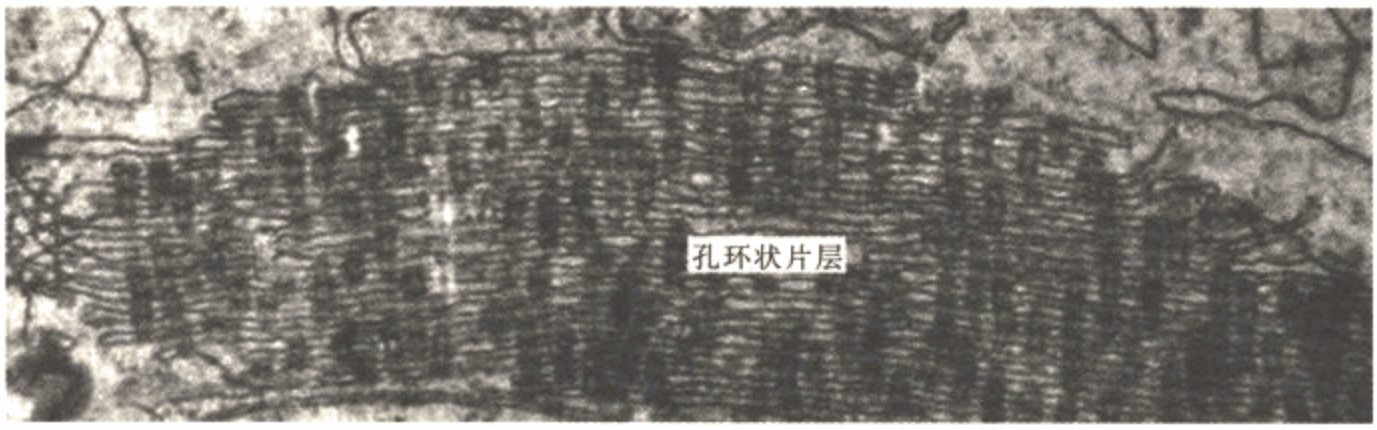
滑面内质网也称无颗粒内质网（agranular endoplasmic reticulum，AER）。电镜下呈表面光滑的管、泡样网状形态结构（图 5-1B），并常常可见与粗面内质网相互连通。

滑面内质网是一种多功能的细胞器。在不同细胞或同一细胞的不同生理时期，其结构形态、胞内空间分布及发达程度差异甚大，并常常表现出完全不同的功能特性。

两种类型的内质网在不同组织细胞中的分布状况各不相同。有的细胞中皆为粗面内质网；有的细胞中全部为滑面内质网；还有些细胞中则是二者以不同的比例共存，并且可以随着细胞不同发育阶段或生理功能状态的变化而相互发生类型的转换。

（三）某些特殊组织细胞中存在内质网的衍生结构

除了上述两种基本形态结构类型的内质网之外，在某些特殊组织细胞中还存在着一些由内质网局部分化、衍生而来的异型结构。比如，见于视网膜色素上皮细胞中的髓样体（myeloid body）、出现于生殖细胞、快速增殖细胞、某些哺乳类动物的神经元和松果体细胞以及一些癌细胞中的孔环状片层（annulate lamellae）体等。这些异型结构亦可被看作是内质网的第三种结构类型形式（图 5-3）。



●图 5-3　异型内质网孔环状片层结构

四、内质网的功能

（一）粗面内质网与外输性蛋白质的分泌合成、加工修饰及转运过程密切相关

粗面内质网与外输性蛋白质加工合成、转运分泌过程密切相关的功能，具体地体现为以下几个方面：

1. 作为核糖体附着的支架　细胞中所有蛋白质的合成，皆起始于细胞质基质中游离的核糖体上。然而，许多蛋白质多肽链的延伸，在其合成起始后不久，必须随同合成活动所在的核糖体一起转移、附着于粗面内质网上才能得以为继并最终完成。所以，粗面内质网最基本的功能之一，就是为某些正在进行蛋白质合成的核糖体提供了附着的支架。由附着型核糖体合成的蛋白质有：

（1）外输性或分泌性蛋白质：包括几乎所有的肽类激素、多种细胞因子、抗体、消化

酶、细胞外基质蛋白等。

（2）膜整合蛋白质：例如膜抗原、膜受体等功能性膜蛋白。

（3）构成细胞器中的驻留蛋白：定位于包括粗面内质网自身在内的滑面内质网、高尔基复合体、溶酶体等各种细胞器中的可溶性驻留蛋白。这些蛋白质，均须经由粗面内质网进行修饰、加工和转运。

2. 新生多肽链的折叠与装配　多肽链的氨基酸组成和排列顺序，决定了蛋白质的基本理化性质；而蛋白质功能的实现，却直接地依赖于多肽链依其特定的方式盘旋、折叠所形成的高级三维空间结构。内质网为新生多肽链的正确折叠和装配提供了有利的环境。

在内质网腔中，丰富的氧化型谷胱甘肽（GSSG），是有利于多肽链上半胱氨酸残基之间二硫键形成的必要条件；附着于网膜腔面的蛋白二硫键异构酶（protein disulfide isomerase，PDI），则使得二硫键的形成及多肽链的折叠速度大大地加快。

存在于内质网中的重链结合蛋白（heavy-chain binding protein，BiP），能够与折叠错误的多肽和尚未完成装配的蛋白亚单位识别结合，并予以滞留。同时还可促使它们的重新折叠、装配与运输。现已证明：BiP 蛋白属于在进化上十分保守的热休克蛋白 70（heat shock protein 70，HSP70）家族的成员。

此类蛋白能够帮助多肽链转运、折叠和组装的结合蛋白，也称做“伴侣”蛋白（chaperone protein）或“分子伴侣”（molecular chaperone）——因它们虽然能够通过与多肽链的识别结合来协助它们的折叠组装和转运，但其本身却并不参与最终产物的形成而得名。存在于内质网中的分子伴侣还有钙网素（calreticulin）和葡萄糖调节蛋白 94（glucose regulated protein94，GRP94）等。后者，也称作内质网素（endoplasmin），被视作为内质网的标志性分子伴侣。

分子伴侣对新生蛋白质的折叠，往往始于多肽链中的某些特殊结构区域。作为分子伴侣蛋白的共同特点是在羧基端有一 Lys-Asp-Glu-Leu（简称 KDEL 序列）四氨基酸滞留信号肽（retention signal peptide），它们能够和内质网膜上的相应受体结合而驻留于网腔不被转运。因此，也被称作驻留蛋白（retention protein）。

由于作为分子伴侣的结合蛋白不仅能够帮助蛋白质的折叠组装和转运，而且能够识别、滞留折叠组装错误的蛋白质不被运输，因此有人认为它们是细胞内蛋白质质量监控的重要因子。

3. 蛋白质的糖基化　所谓糖基化（glycosylation），是指单糖或者寡糖与蛋白质之间通过共价键的结合形成糖蛋白的过程。由附着型核糖体合成并经由内质网转运的蛋白质，其中大多数都要被糖基化。发生在粗面内质网中的糖基化主要是寡糖与蛋白质天冬酰胺残基侧链上氨基基团的结合，所以亦称之为 N-连接糖基化（N-linked glycosylation）。催化这一过程的糖基转移酶是存在于粗面内质网网膜腔面的一种膜整合蛋白质。

据研究，发生在内质网中的蛋白质 N-连接糖基化修饰，均开始于一个共同的前体——一种由 N-乙酰葡萄糖胺、甘露糖和葡萄糖组成的 14 寡糖。寡糖首先与内质网膜中的嵌入脂质分子磷酸多萜醇（dolichol）连接并被其活化，然后才在糖基转移酶的催化下转移连接到新生肽链中特定三肽序列 Asn-X-Ser 或 Asn-X-Thr（X 代表除 Pro 之外的任何氨基酸）的天冬酰胺残基上。

4. 蛋白质的胞内运输　由附着型核糖体合成的各种外输性蛋白质，经过在粗面内质网中的修饰、加工后，最终被内质网膜包裹，并以“出芽”的方式形成膜性小泡而转运。经由粗面内质网的蛋白质胞内运输主要有两个途径：第一条途径是经过在内质网腔的糖基化等作用，以转运小泡的形式进入高尔基复合体，进一步加工浓缩并最终以分泌颗粒的形式

被排吐到细胞之外。这也是最为普遍和最为常见的蛋白分泌途径。第二条途径仅见于某些哺乳动物的胰腺外分泌细胞，其大致过程是：来自粗面内质网的分泌蛋白以膜泡形式直接进入一种大浓缩泡，进而发育成酶原颗粒，然后被排出细胞。通过上述两条不同途径，可见蛋白质分泌的共同特点，即所有分泌蛋白的胞内运输过程，始终是以膜泡形式完全隔离于细胞质基质进行转运的。

（二）信号肽介导分泌性蛋白在粗面内质网合成

所有蛋白质多肽链的合成，均起始于细胞质中游离的核糖体上。那么，这些在起初阶段游离于细胞质基质中的核糖体是如何附着到内质网膜上去的？新生的分泌性蛋白质多肽链又是怎样被转移到内质网网腔中的？

1. 信号肽与信号肽假说　根据 G. Blobel 和 D. Sabatini 的信号肽假说（signal hypothesis），指导蛋白多肽链在粗面内质网上进行合成的决定因素，是被合成肽链 N 端的一段特殊氨基酸序列，即信号肽（signal peptide 或 signal sequence）。通过对编码信号肽的 DNA、mRNA 序列分析以及对氨基酸序列的直接分析，均证明：信号肽普遍地存在于所有分泌蛋白肽链的氨基端，是一段由不同数目、不同种类的氨基酸组成的疏水氨基酸序列。

除了信号肽的指导性作用之外，核糖体与内质网的结合以及肽链穿越内质网膜的转移，还有赖于细胞质基质中信号识别颗粒（signal recognition particle，SRP）的介导和内质网膜上的信号识别颗粒受体（SRP-receptor，SRP-R）及被称之为移位子（translocon）的通道蛋白的协助。这一过程的基本步骤大致如下：

（1）新生分泌性蛋白质多肽链在细胞质基质中的游离核糖体上起始合成。当新生肽链 N 端的信号肽被翻译后，可立即被细胞质基质中的 SRP 识别、结合。所谓 SRP 是由 6 个多肽亚单位和 1 个沉降值为 7S 的小分子 RNA 构成的复合体。其一端与被翻译后的信号肽结合，另一端则结合于核糖体上，从而形成 SRP-核蛋白体复合结构，并可使得翻译暂时终止，肽链的延长受到阻遏。

（2）与信号肽结合的 SRP，识别、结合内质网膜上的 SRP-R，并介导核糖体锚泊附着于内质网膜的通道蛋白移位子上。而 SRP 则从信号肽-核糖体复合体上解离，返回细胞质基质中重复上述过程。此时，暂时被阻遏的肽链延伸又继续进行。

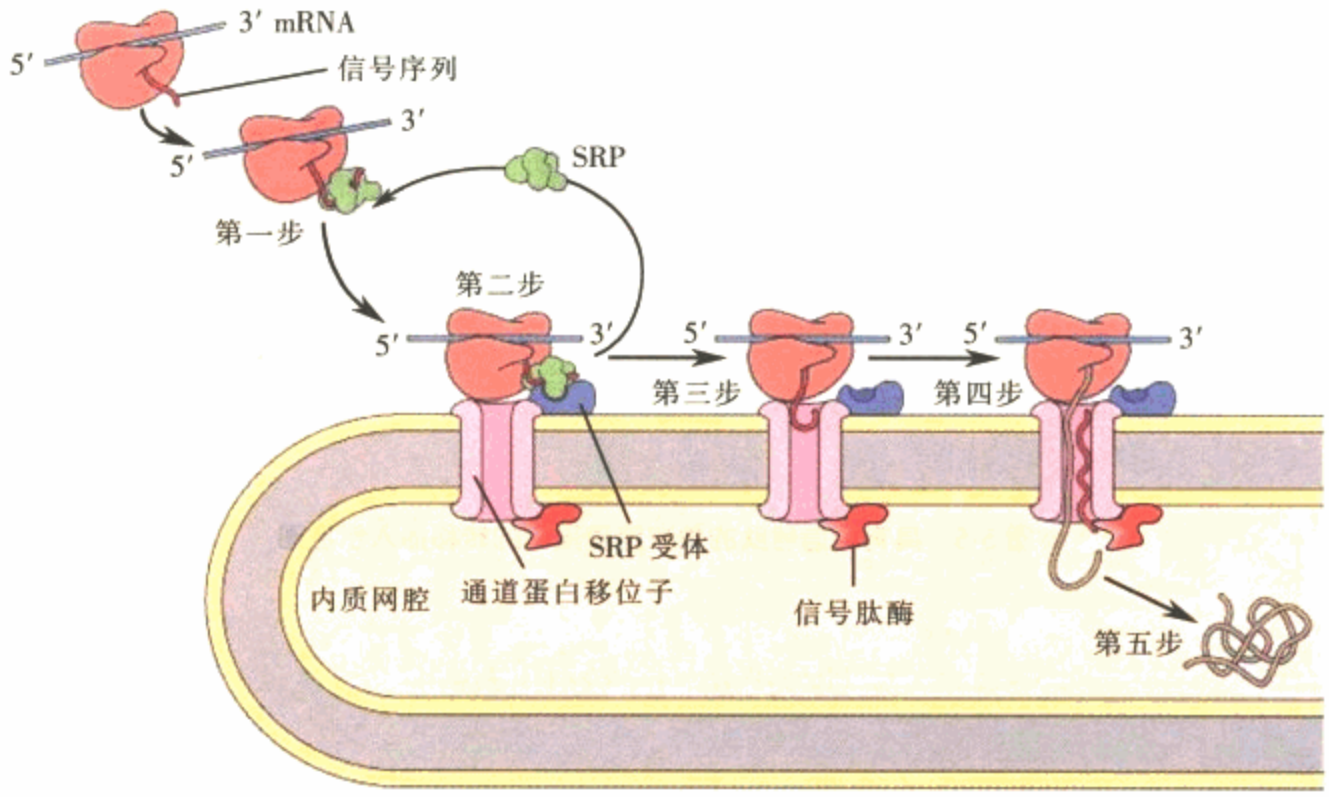
SRP-R 是内质网的一种膜整合蛋白。由于该蛋白能够通过与 SRP 的识别而使得核糖体结合附着于内质网上，因此有人也称之为锚泊蛋白（docking protein）。

（3）在信号肽的引导下，合成中的肽链，通过由核糖体大亚基的中央管和移位子蛋白共同形成的通道，穿膜进入内质网网腔。随之，信号肽序列被内质网膜腔面的信号肽酶切除，新生肽链继续延伸，直至完成而终止。最后，完成肽链合成的核糖体大、小亚基解聚，并从内质网上解离。

移位子也称作转移器（translocation apparatus 或 translocator），是内质网膜上的一种亲水通道。其外径 8.5nm 左右，中央孔直径平均为 2nm。有学者认为：内质网上的移位子是一种动态结构，并以两种可转化的构象形式存在。即当它和信号肽结合时，处于一种开放的活性状态；在蛋白质多肽链被完全转移之后，则转变为无活性的关闭状态。

有关移位子的存在及其与蛋白质穿膜转运之间的关系，已经获得有力的实验证据支持。处于蛋白转运功能活性状态下的移位子中央孔，常常被正在通过的延伸中的多肽链所充塞；用嘌呤霉素（puromycin）处理，使新生的多肽链从核糖体上解离释放下来，可用电生理学方法检测出流过移位子中央孔的离子流。但是，如果用高盐溶液冲洗，使核糖体从内质网膜上脱落时，移位子即处于关闭状态，也就无法检测到内质网膜上移位子孔的存在。这表明：核糖体的结合，是移位子孔开放所必需的条件。

在哺乳动物，内质网移位子主要是由一种与蛋白分泌相关的多肽 Sec61p 组成的亲水性复合结构体。肽链穿越内质网的转移机制及与之相关的信号肽、SRP、SRP-R 及移位子的相互作用如图 5-4 所示。



●图 5-4　新生肽链穿越内质网的转移过程示意图

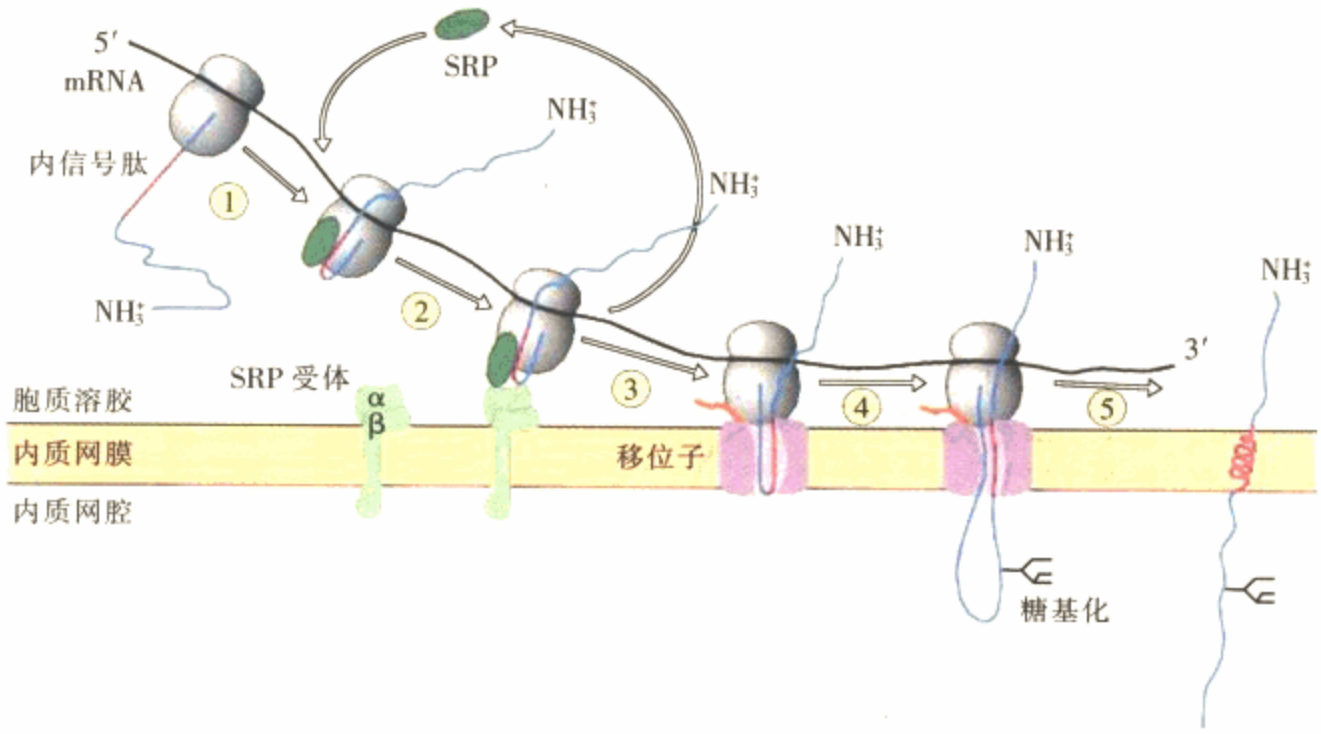
2. 跨膜驻留蛋白的插入与转移　跨膜驻留蛋白，尤其是多次跨膜蛋白的插入转移，远比可溶性分泌蛋白的转移过程更为复杂。

（1）单次跨膜蛋白插入内质网膜有两种可能的机制

1）新生肽链协同翻译插入（cotranslation insertion）机制：这是一种相对较为简单的转移、插入机制。一些新生的单次跨膜驻留蛋白既含有位于肽链 N-端的起始转移信号肽，同时还含有存在于多肽链中的停止转移肽（stop-transfer peptide 或 halt-transfer peptide）——肽链中一段由特定氨基酸序列组成的疏水区段，也有人称之为停止转移信号（stop-transfer signal）。在由信号肽引导的肽链转移过程中，当停止转移肽进入移位子并与其相互作用时，移位子即由活性状态转换为钝化状态而终止肽链的转移；N-端起始转移信号肽从移位子上解除释放；停止转移肽段形成单次跨膜 α-螺旋结构区，使得蛋白肽链的 C-端滞留于细胞质一侧。

2）由内信号肽（internal signal peptide）介导的内开始转移肽（internal start-transfer peptide）插入转移机制：所谓内信号肽，即位于多肽链中的信号肽序列。内信号肽具有与 N 端信号肽同样的功能。随着合成肽链的延长，当内信号肽序列被合成并到达移位子时，即被保留在类脂双分子层中，成为单次跨膜的 α-螺旋结构。在由内信号肽引导的插入转移过程中，插入的内开始转移肽能够以方向不同的两种形式进入移位子。如果在内信号肽疏水核心氨基端有比其羧基端更多的带正电荷氨基酸序列组成，这时插入的方向为羧基端进入内质网腔面；反之则其插入方向相反（图 5-5）。

（2）多次跨膜蛋白质的转移插入过程虽然远比单次跨膜蛋白要复杂的多，但是其基本机制是大致相同的。在多次跨膜蛋白肽链上，常常有两个或者两个以上的疏水性起始转移肽结构序列和停止转移肽结构序列。一般认为，多次跨膜蛋白是以内信号肽作为其开始转移信号的。



●图 5-5　具有内信号肽的单次跨膜蛋白的转移插入示意图

经典实验：信号肽假说

研究背景

20 世纪 50 年代的研究表明，分泌蛋白是由膜结合型核糖体合成的，并在其合成的过程中发生了跨膜转运。然而，当时无法解释的现象是：为什么合成分泌蛋白的核糖体是膜结合型的核糖体，而合成胞浆蛋白的核糖体却不与膜结合。为了解释这一现象，Günter Blobel 和 David Sabatini 于 1971 年提出假说，认为：①将要在膜结合型核糖体上进行翻译的 mRNA，在其翻译起始位点的 3′端含有一些独特的密码子；②这样一来，在翻译形成的多肽链的氨基末端，会添加上一段独特的序列（即信号肽）；③这段信号肽能够使核糖体附着于膜上。1975 年，Blobel 和 Bernhard Dobberstein 报道的一系列实验结果为上述观点提供了重要证据。他们对上述观点进行了补充后，最终形成了“信号肽假说”。

实验内容

研究表明，骨髓瘤是一种 B 淋巴细胞肿瘤，能够大量分泌免疫球蛋白（因此常被用作研究分泌蛋白的模型）。Cesar Milstein 实验室的研究显示，对免疫球蛋白轻链的 mRNA 进行体外翻译所得到的蛋白质，其氨基末端比细胞分泌的免疫球蛋白轻链多了约 20 个氨基酸。该结果提示，这些氨基酸可能介导了核糖体与膜的结合。为验证这一假设，Blobel 和Dobberstein 利用骨髓瘤细胞，对膜结合型核糖体合成轻链的过程进行了研究。

正如所料，利用游离核糖体在体外翻译轻链 mRNA 所生成的蛋白质，其分子量大于细胞所分泌的轻链蛋白；而利用骨髓瘤细胞中的膜结合型核糖体对该轻链 mRNA 进行体外翻译，所生成的蛋白质则与细胞分泌的轻链蛋白大小相同。他们进一步的研究表明，膜结合型核糖体合成的轻链蛋白能够抵抗蛋白酶的消化作用，而且合成的轻链蛋白与微粒体(microsome) 结合在一起，这提示，由核糖体合成的轻链蛋白可能已经被转运到了微粒体中。

上述结果表明，在新合成的多肽链的跨膜转运过程中，其氨基末端的信号肽被微粒体中的蛋白酶切割去除。这些结果在细节上对信号肽假说进行了补充。正如 Blobel 和

Dobberstein 所述，信号肽假说的基本观点是：对于编码跨膜转运蛋白质的 mRNA 而言，其起始密码子的下游紧邻着一段独特的编码序列（编码信号肽）。

发表论文

Günter Blobel and Bernhard Dobberstein（Rockefeller University，New York，USA）：Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. J. Cell Biol. 1975，67：835-851.

后续影响

蛋白质的选择性跨膜转运对维系真核细胞的膜性细胞器的功能具有重要作用。为了维持细胞器的正常功能，蛋白质需要穿过相应的膜结构而向特定的部位转运，信号肽假说为解释该现象提供了理论基础。该假说不仅在分泌蛋白向内质网转运的过程中得到了印证，也为理解蛋白质向细胞内其他膜性结构定向转运的机制提供了理论支持，因此，信号肽假说的后续影响涉及了细胞生物学的所有研究领域。Blobel 也因此而荣膺 1999 年的诺贝尔生理学或医学奖。

（三）滑面内质网是作为胞内脂类物质合成主要场所的多功能细胞器

滑面内质网是细胞内脂类合成的重要场所。然而，不同细胞类型中的滑面内质网，因其化学组成上的某些差异及所含酶的种类不同，常常表现出完全不同的功能作用。兹择要介绍如下：

1. 滑面内质网参与脂质的合成和转运　脂类合成是滑面内质网最为重要的功能之一。经由小肠吸收的脂肪分解物甘油、甘油一酯和脂肪酸，进入细胞之后，在内质网中可被重新合成为甘油三酯。一般认为，在滑面内质网合成的脂类常常会与粗面内质网来源的蛋白质结合形成脂蛋白，然后经由高尔基复合体分泌出去。比如，在正常肝细胞中合成的低密度脂蛋白（low-density lipoprotein，LDL）和极低密度脂蛋白（very-low-density lipoprotein，VLDL）等物质，被分泌后可携带、运输血液中的胆固醇和甘油三酯以及其他脂类到脂肪组织。如果阻断脂蛋白经由高尔基复合体的运输途径，就会造成脂类在内质网中的积聚引起脂肪肝。

在类固醇激素分泌旺盛的细胞，其发达的滑面内质网中存在着与类固醇代谢密切相关的关键酶。这说明，脂肪的合成、类固醇的代谢是在滑面内质网中进行的。

除线粒体特有的两种磷脂外，细胞所需要的全部膜脂几乎都是由内质网合成的。内质网脂质合成的底物来源于细胞质基质；催化脂质合成的相关酶类是定位于内质网膜上的膜镶嵌蛋白；脂质合成起始并完成于内质网膜的胞质侧，其大致过程是：

（1）首先是脂酰基转移酶（acyl transferase）催化脂酰辅酶 A（fatty acyl CoA）与甘油-3-磷酸反应，把 2 个脂肪酸链转移、结合到甘油-3-磷酸分子上形成磷脂酸（phosphatidic acid）；

（2）继而在磷酸酶的作用下，使磷脂酸去磷酸化生成双酰甘油；

（3）然后，再由胆碱磷酸转移酶（choline phosphotransferase）催化，在双酰甘油上添加结合一个极性基团，最终形成由一个极性头部基团和两条脂肪酸链疏水尾部构成的双亲媒性脂类分子。

通过以上过程合成的极性甘油二酯双亲媒性脂类物质，借助于转位酶（flippase）的作用，很快被转向内质网腔面；最终再被输送到其他的膜上。

就目前所知，脂质由内质网向其他膜结构的转运主要有两种形式：一是以出芽小泡的形式转运到高尔基复合体、溶酶体和质膜；二是以水溶性的磷脂转换蛋白（phospholipid

exchange proteins，PEP）作为载体，与之结合形成复合体进入细胞质基质，通过自由扩散，到达缺少磷脂的线粒体和过氧化物酶体膜上。

磷脂转换蛋白亦称磷脂转移蛋白（phospholipid transfer protein）。体外实验显示：每一种磷脂转换蛋白只能专一性地识别一种磷脂，以单分子形式，从内质网膜提取并进行膜间的磷脂分子载运转移。

2. 滑面内质网参与糖原的代谢　存在于肝细胞中滑面内质网网膜的葡萄糖-6-磷酸酶，能够催化糖原在细胞质基质中的降解产物葡萄糖-6-磷酸的去磷酸化；去磷酸化后的葡萄糖，更易于透过脂质双层膜，然后经由内质网被释放到血液中。这说明内质网参与了糖原的分解过程。然而，目前尚有以下几个问题值得进一步深入探讨和研究：①在粗面内质网和滑面内质网中均有葡萄糖-6-磷酸酶的活性，但是却为什么只是在滑面内质网中与糖原密切结合；②关于葡萄糖-6-磷酸酶分子的活性部位，以前一直认为是存在于内质网膜的内侧，因此需要一个使作用物和反应产物通过内质网膜的附加运输系统。但是，近年来的一些研究报道认为，这一附加的运输系统是不需要的；③葡萄糖-6-磷酸酶究竟存在于内质网膜中的什么位置。

至于内质网是否也参与了糖原的合成过程，目前还存在着截然不同的两种观点。

3. 滑面内质网是细胞解毒的主要场所　肝脏是机体中外源性、内源性毒物及药物分解解毒的主要器官组织。肝脏的解毒作用主要由肝细胞中的滑面内质网来完成。在肝细胞滑面内质网上，含有丰富的氧化及电子传递酶系，包括细胞色素 P450、NADPH-细胞色素 P450 还原酶、细胞色素 b5、NADH-细胞色素 b5 还原酶、NADPH-细胞色素 c 还原酶等。其解毒的基本机制是，在电子传递的氧化还原过程中，通过催化多种化合物的氧化或羟化，一方面，使得毒、药物的毒性被钝化或者破坏；另一方面，则由于羟化作用而增强了化合物的极性，使之更易于排泄。当然，这种氧化作用也可能会使某些物质的毒性增强。

内质网电子传递链和线粒体电子传递链不同的是：其一，链的组成比线粒体较短；其二，它所催化的反应，实质上都是在作用物分子中加入一个氧原子。因此，有人也把内质网电子传递链酶系称作羟化酶或加单氧酶（monooxygenase）系。还有人称之为混合功能氧化酶（mixed function oxidase）。

4. 滑面内质网是肌细胞 Ca^{2+} 的储存场所　在肌细胞中，十分发达的滑面内质网特化为一种特殊的结构——肌质网（sarcoplasmic reticulum）。

通常状况下，肌质网网膜上的 Ca^{2+}-ATP 酶把细胞质基质中的 Ca^{2+} 泵入网腔储存起来；当受到神经冲动的刺激或者细胞外信号物质的作用时，即可引起 Ca^{2+} 向细胞质基质的释放。

在肌质网腔中存在的钙结合蛋白浓度为 30~100mg/ml；每个钙结合蛋白分子可与 30 个左右的 Ca^{2+} 结合，这就使得内质网中的 Ca^{2+} 浓度高达 3mmol/L。内质网中高浓度的 Ca^{2+} 和钙离子结合蛋白的存在，还能够阻止内质网运输小泡的形成。这说明，Ca^{2+} 浓度的变化，可能对运输小泡的形成具有一定的调节作用。

5. 滑面内质网与胃酸、胆汁的合成与分泌密切相关　在胃壁腺上皮细胞中，滑面内质网可使 Cl^- 与 H^+ 结合生成 HCl；在肝细胞中，滑面内质网不仅能够合成胆盐，而且，可通过所含葡萄糖醛酸转移酶的作用，使非水溶性的胆红素颗粒形成水溶性的结合胆红素。

第二节　高尔基复合体

1898 年，意大利学者 C. Golgi 用银染技术对猫头鹰脊髓神经节进行光镜观察时首次发现：在细胞核周围的细胞质基质中，存在一种嗜银的网状结构，并称之为内网器（internal

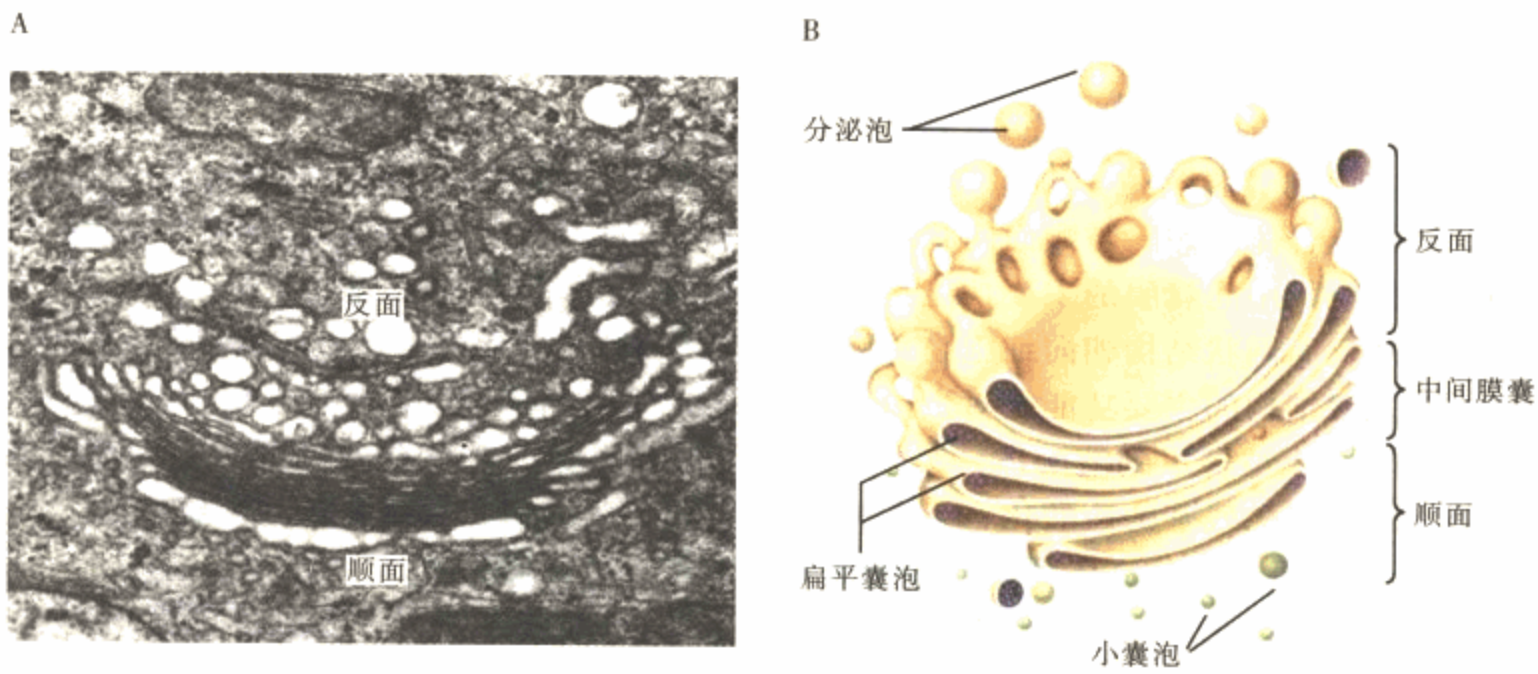
reticular apparatus)。此后，在多种细胞中也相继发现了类似的结构。后来的学者，为了纪念高尔基，就用高尔基体（Golgi body）取代了内网器这一名称。

在高尔基体被发现后的很长一段时间内，有关高尔基体的形态结构，甚至高尔基体是否是细胞质中的一种客观存在，曾经成为当时许多细胞学家争论的焦点问题之一。直到20世纪50年代，随着电子显微镜及其超薄切片技术的应用和发展，不仅证明了高尔基体的真实存在，而且使得人们对其有了新的、更为深入和清楚的认识；并根据高尔基体在电镜下的亚显微形态结构特点，将之更名为高尔基复合体（Golgi complex）。

一、高尔基复合体的形态结构

（一）高尔基复合体是由三种不同类型的膜性囊泡组成的细胞器

电镜观察表明，高尔基复合体是一种膜性的囊、泡结构复合体。在其整体形态上，不同囊、泡具有明显的极性分布特征。据此，以前一般将高尔基复合体划分为三个组成部分(图5-6)：



●图5-6　高尔基复合体的结构

A. 高尔基复合体透射电镜图　B. 高尔基复合体结构模式图

1. 扁平囊泡　扁平囊泡（cisternae）是高尔基复合体中最具特征的主体结构组分。通常，每3~8个略呈弓形弯曲的扁平囊泡整齐地排列层叠在一起，构成高尔基复合体的主体结构——高尔基体堆（Golgi stack）。扁平囊泡囊腔宽约15~20nm；相邻囊间距20~30nm。其凸面朝向细胞核，称之为顺面（cis face）或形成面（forming face）；凹面侧向细胞膜，称作反面（trans face）或成熟面（mature face）。形成面膜厚6nm左右，与内质网膜厚度相近似；成熟面膜厚8nm左右，与细胞膜厚度相近。

2. 小囊泡　小囊泡（vesicles）聚集分布于高尔基复合体形成面，是一些直径为40~80nm的膜泡结构，包括两种类型：相对较多的一类为表面光滑的小泡；较小的一类是表面有绒毛样结构的衣被小泡（coated vesicle）。一般认为这些小囊泡是由其附近的粗面内质网芽生、分化而来，并通过这种形式把内质网中的蛋白质转运到高尔基复合体中来。因此，也被称作为运输小泡（transfer-vesicle）。它们可通过相互融合，形成扁平囊泡。一方面完成了从内质网向高尔基复合体的物质转运，另一方面，也使扁平囊泡的膜结构及其内含物不断地得以更新和补充。

3. 大囊泡　大囊泡（vacuoles）也称作分泌泡（secreting vacuoles），直径为0.1~

0.5μm；见于扁平囊泡成熟面，系由扁平囊泡末端膨大、断离而形成。不同分泌泡在电镜下所显示的不同电子密度，可能是它们不同成熟程度的反映。

（二）高尔基复合体具有显著的极性

无论是常规的电镜观察图像，还是应用重金属选择性浸染新技术结合多角度观察、拍摄图像重组的高尔基复合体三维结构模型以及单克隆抗体免疫电镜技术的研究，均显示高尔基复合体具有明显的极性形态结构特征。

构成高尔基复合体主体的膜（扁平）囊，从形成面到成熟面可呈现为典型的扁平囊状、管状或管、囊复合形式等不同的结构形态；各层膜囊的标志化学反应及其所执行的功能亦不尽相同。因此，近年来有学者提出：高尔基复合体膜囊层依次可被划分为顺面高尔基网状结构（cis Golgi network）、高尔基中间膜囊（medial Golgi stack）和反面高尔基网状结构（trans Golgi network）等三个组成部分。

顺面高尔基网状结构又称顺面膜囊，靠近内质网一侧，呈连续分支的管网状结构，显示嗜锇反应的化学特征。一般认为，该结构区域的功能有两个：第一是分选来自内质网的蛋白质和脂类，并将其大部分转入到高尔基中间囊膜，小部分重新送返内质网而成为驻留蛋白；第二是进行蛋白质修饰的 O-连接糖基化以及跨膜蛋白在细胞质基质侧结构域的酰基化。所谓 O-连接糖基化与发生在内质网中的 N-连接糖基化不同，其寡糖连接部位是蛋白质多肽链中丝氨酸等氨基酸残基侧链的 OH 基团。

高尔基中间囊膜是位于顺面高尔基网状结构和反面高尔基网状结构之间的多层间隔囊、管结构复合体系。除与顺面网状结构相邻的一侧对 NADP 酶反应微弱外，其余各层均有较强的反应。中间囊膜的主要功能是进行糖基化修饰和多糖及糖脂的合成。

高尔基反面网状结构朝向细胞膜一侧，在其形态结构和化学特性上具有细胞的差异性和多样性。该结构的主要功能是对蛋白质进行分选，最终使得经过分选的蛋白质，或被分泌到细胞外，或被转运到溶酶体。另外，某些蛋白质的修饰作用也是在此进行和完成的。比如蛋白质酪氨酸残基的硫酸化、半乳糖 α-2，6 位的唾液酸化及蛋白质的水解等。

（三）高尔基复合体在不同的组织细胞中呈现不同的分布形式

高尔基复合体在不同的组织细胞中具有不同的分布特征。例如，在神经细胞中的高尔基复合体一般是围绕细胞核分布；在输卵管内皮、肠上皮黏膜、甲状腺和胰腺等具有生理极性的细胞中，常常在细胞核附近趋向于一极分布；在肝细胞中，则沿胆小管分布在细胞边缘；在精、卵等少数特殊类型的细胞和绝大多数无脊椎动物的某些细胞中，可见到高尔基复合体呈分散的分布状态。另有研究结果显示，在非极性的动物间期细胞中，高尔基复合体往往位于中心粒附近。如果用秋水仙碱处理细胞，高尔基复合体会失去原有的典型结构特征，并出现弥散性分布；去除秋水仙碱后，其又能够很快恢复到原来的结构和分布状态。这表明：高尔基复合体在中心粒附近的分布与微管相关。

此外，高尔基复合体的数量和发达程度，也因细胞的生长、发育分化程度和细胞的功能类型不同而存在较大的差异，并且会随着细胞的生理状态而变化。一般而言，在分化发育成熟且具有旺盛分泌功能活动的细胞中，高尔基复合体也较为发达。

二、高尔基复合体的化学组成

（一）脂类是高尔基复合体膜的基本成分

作为一种膜性结构细胞器，脂类是高尔基复合体结构最基本的化学组分。从大鼠肝细胞分离的高尔基复合体，其脂类总含量约 45%左右；大量的分析资料表明，高尔基复合体膜的脂类成分含量介于质膜与内质网膜之间（表 5-1）。

表 5-1　高尔基复合体膜、质膜和内质网膜脂类及其含量对比

膜的类型	脂类及其含量(%)					
	总脂含量	磷脂酰乙醇胺	卵磷脂	神经鞘磷脂	磷脂酰丝氨酸	胆固醇
质膜	40	34.4	32.0	19.2	4.6	0.51
高尔基复合体	45	36.5	31.4	14.2	4.7	0.47
内质网膜	61	35.8	47.8	3.4	5.6	0.12

（二）高尔基复合体含有以糖基转移酶为标志的多种酶蛋白体系

在细胞不同结构区域中，酶的分布种类及含量，往往反映着该结构区域的主要功能特性。一般认为，糖基转移酶（glycosyltransferase）是高尔基复合体中最具特征性的酶。它们主要参与糖蛋白和糖脂的合成。

同时，在高尔基复合体中还存在着其他的一些重要的酶类，它们是：①包括 NADH-细胞色素 C 还原酶和 NADPH-细胞色素还原酶的氧化还原酶；②以 5′-核苷酸酶、腺苷三磷酸酶、硫胺素焦磷酸酶为主体的磷酸酶类；③参与磷脂合成的溶血卵磷脂酰基转移酶和磷酸甘油磷脂酰转移酶；④由磷脂酶 A_1 与磷脂酶 A_2 组成的磷脂酶类；⑤酪蛋白磷酸激酶；⑥α-甘露糖苷酶等。

根据 James E. Rothman 等人近些年来的研究报道：通过密度梯度离心技术可分离出 3 种不同密度的高尔基复合体碎片；而每一种密度的碎片都分别与一组酶相关联。密度最大者含有磷酸转移酶，它们能催化磷酸酶与溶酶体蛋白的结合；中等密度者含有甘露糖苷酶和 N-乙酰葡萄糖胺转移酶；而半乳糖基转移酶及唾液酸基转移酶则主要存在于低密度碎片。这也证明了在高尔基复合体中至少具有 3 种不同结构和功能分化的高尔基膜囊。也正是基于此研究结果，Rothman 等人提出了高尔基复合体叠层存在生化区隔化或房室化的新观点。

此后的转移酶单克隆抗体免疫细胞化学电镜技术研究分析发现：N-乙酰葡萄糖胺转移酶Ⅰ只存在于高尔基器叠层中央的 2~3 个扁囊中；半乳糖基转移酶也仅存于反面扁囊中；而磷酸转移酶则几乎可以肯定地存在于顺面扁囊之中。这一发现，为高尔基复合体叠层的生化区隔化或房室化提供了新的证据。表 5-2 是常见于高尔基复合体中的一些主要的酶类及其分布。

高尔基复合体中含有极为丰富的蛋白质和较为多样的酶类。凝胶电泳分析显示，高尔基复合体蛋白的组成含量和复杂程度亦介于内质网和细胞膜之间，其中一些蛋白质与内质网是相同的。因此，有理由推断：高尔基复合体是构成质膜和内质网之间相互联系的一种过渡性细胞器。

表 5-2　分布于高尔基复合体不同结构区域中的几种主要酶类

酶	分布部位			酶	分布部位		
	顺面	中间膜囊	反面		顺面	中间膜囊	反面
乙酰葡萄糖胺转移酶Ⅰ		+		甘露糖酶Ⅰ	+		
甘露糖苷酶Ⅱ		+		酸性磷酸酶			+
NADP 酶系		+		核苷二磷酸酶			+
磷脂酶		+		唾液酸转移酶			+
腺苷酸环化酶	+	+	+	硫胺素焦磷酸酶			+
5′核苷酶	+	+	+	半乳糖基转移酶			+
脂肪酰基转移酶	+						

三、高尔基复合体的功能

作为内膜系统的主要结构组成之一，高尔基复合体不仅和内膜系统其他结构组分一起构成了胞内物质转运的特殊通道，而且也是胞内物质合成、加工的重要场所。其主要的功能作用包括：

（一）高尔基复合体是细胞内蛋白质运输分泌的中转站

早在20世纪60年代中期，J. Jamieson和Palade等人，运用放射性同位素标记示踪技术，注射^{3}H标记的亮氨酸于豚鼠胰腺细胞，3分钟后，标记的亮氨酸即出现于内质网中；约20分钟后，从内质网进入到高尔基复合体；120分钟后，则出现、存在于细胞顶端的分泌泡并开始释放。该实验清楚地显示了外输性分泌蛋白在细胞内的合成及其转运途径。此后的研究进而证明，除了外输性分泌蛋白之外，胞内溶酶体中的酸性水解酶蛋白、多种细胞膜蛋白以及胶原纤维等细胞外基质成分也都是经由高尔基复合体进行定向转送和运输的。因此，可以说高尔基复合体是细胞内蛋白质运输分泌的中转站。

外输性分泌蛋白具有连续分泌（continuous secretion）和非连续分泌（discontinuous secretion）两种不同的排放形式。前者又称恒定型分泌（constitutive secretion），是指外输性蛋白质在其分泌泡形成之后，随即排放出细胞的分泌形式；而后者则是先储存于分泌泡中，在需要时再排放到细胞外的分泌形式。

（二）高尔基复合体是胞内物质加工合成的重要场所

1. 糖蛋白的加工合成　内质网合成并经由高尔基复合体转送运输的蛋白质，绝大多数都是经过糖基化修饰加工合成的糖蛋白，主要包括N-连接糖蛋白和O-连接糖蛋白两种类型。前者，其糖链合成与糖基化修饰始于内质网，完成于高尔基复合体；后者，则主要或完全是在高尔基复合体中进行和完成的。O-连接糖基化寡糖链结合的蛋白质多肽链中的氨基酸残基通常有丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸（或胶原纤维中的羟赖氨酸与羟脯氨酸）。除了蛋白聚糖外，几乎所有O-连接寡糖中与氨基酸残基侧链OH直接结合的第一个糖基都是N-乙酰半乳糖胺（蛋白聚糖中第一个糖基通常是木糖）；组成O-连接寡糖链中的单糖组分，是在糖链的合成过程中一个个地添加上去的。表5-3是N-连接糖蛋白与O-连接糖蛋白之间的主要差别。

表5-3　N-连接糖蛋白和O-连接糖蛋白的主要差别

	N-连接糖蛋白	O-连接糖蛋白
糖基化发生部位	粗面内质网	高尔基复合体
连接的氨基酸残基	天冬氨酸	丝氨酸　苏氨酸　酪氨酸　羟赖(脯)氨酸
连接基团	$—NH_2$	—OH
第一个糖基	N-乙酰葡糖胺	半乳糖　N-乙酰半乳糖胺
糖链长度	5～25个糖基	1～6个糖基
糖基化方式	寡糖链一次性连接	单糖基逐个添加

将细胞置于含有用^{3}H标记的甘露糖培养基中短期培养，然后进行放射自显影示踪测定发现：银染颗粒仅出现于内质网中；用^{3}H-N-乙酰葡萄糖胺培养标记，银粒在内质网和高尔基复合体中同时出现；而用半乳糖和^{3}H-唾液酸糖标记培养，则只在高尔基复合体中发现了银粒的存在。这说明，甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺位于糖蛋白寡聚糖链的核心，存在于内质网腔；而半乳糖、唾液酸则位于寡糖链的远端，存在于高尔基复合体中。因此，高尔基复合体不仅具有对于内质网来源的蛋白质的修饰加工作用，而且还是糖蛋白中多

（寡）糖组分及分泌性多糖类合成的场所。

在糖蛋白的形成过程中，对糖蛋白中寡糖链的修饰加工，是高尔基复合体的主要功能之一。由内质网转运而来的糖蛋白，在进入高尔基复合体后，其寡糖链末端区的寡糖基往往要被切去，与之同时，再添加上新的糖基，比如 UDP-半乳糖、UDP-葡萄糖和 UDP-唾液酸等。

蛋白质糖基化的重要意义在于：

（1）糖基化对蛋白质具有保护作用，使它们免遭水解酶的降解；

（2）糖基化具有运输信号的作用，可引导蛋白质包装形成运输小泡，以便进行蛋白质的靶向运输；

（3）糖基化形成细胞膜表面的糖被，在细胞膜的保护、识别以及通讯联络等生命活动中发挥重要作用。

2. 蛋白质的水解加工　对蛋白质的水解修饰，是高尔基复合体物质加工修饰功能的另一种体现形式。某些蛋白质或酶，只有在高尔基复合体中被特异性地水解后，才能够成熟或转变为其作用的活性存在形式。例如人胰岛素，在内质网中是以由 86 个氨基酸残基组成，含有 A、B 两条肽链和起连接作用的 C 肽所构成的胰岛素原的形式而存在。当它被转运到高尔基复合体时，在水解切除 C 肽后才成为有活性的胰岛素。还有，胰高血糖素、血清白蛋白等的成熟，也都是经过在高尔基复合体中的切除修饰完成的。

此外，业已证实，溶酶体酸性水解酶的磷酸化、蛋白聚糖类的硫酸化等，均发生和完成于通过高尔基复合体的转运过程中。

（三）高尔基复合体是胞内蛋白质的分选和膜泡定向运输的枢纽

高尔基复合体在细胞内蛋白质的分选和膜泡的定向运输中具有极为重要的枢纽作用。其可能的机制是：通过对蛋白质的修饰、加工，使得不同的蛋白质带上了可被高尔基复合体网膜上专一受体识别的分选信号，进而选择、浓缩，形成不同去向的运输和分泌小泡。这些分泌小泡的运输主要有三条可能的途径和去向：①经高尔基复合体单独分拣和包装的溶酶体酶，以有被小泡的形式被转运到溶酶体；②分泌蛋白以有被小泡的形式运向细胞膜或被分泌释放到细胞外；③以分泌小泡的形式暂时性地储存于细胞质中，在有需要的情况下，再被分泌释放到细胞外去。

第三节　溶　酶　体

溶酶体（lysosome）是内膜系统的另一种重要结构组分。有关溶酶体可能存在的最早证据资料，是 1949 年 C. de Duve 在对大鼠肝组织匀浆细胞组分进行差速离心分离分析研究时意外地获得的。他们在寻找与糖代谢有关的酶时发现，作为对照的酸性磷酸酶活性主要集中在线粒体分离层。引起研究者注意的另一个实验现象是：酸性磷酸酶活性在蒸馏水提取物中高于蔗糖渗透平衡液抽提物；在放置一段时间的抽提物中高于新鲜制品，而且酶的活性与沉淀的线粒体物质无关。由此他们推断：在线粒体分离层组分中可能存在另一种细胞器。这一推断，在 1955 年由 Christian Duve 和 A. Novikoff 等对鼠肝细胞的电镜观察中得以证实。并因其内含多种水解酶而被命名为溶酶体。

一、溶酶体的形态结构和化学组成

（一）溶酶体是一种具有高度异质性的膜性结构细胞器

溶酶体普遍地存在于各类组织细胞之中。电镜下可见系由一层单位膜包裹而成。膜厚

约 6nm，通常呈球形。其大小差异显著，一般直径为 0.2~0.8μm，最小者直径仅0.05μm，而最大者直径可达数微米。典型的动物细胞中约含有几百个溶酶体，但是，在不同细胞中溶酶体的数量差异是巨大的。一般而言，在溶酶体中可含有 60 多种能够分解机体中几乎所有生物活性物质的酸性水解酶，这些酶作用的最适 pH 通常在 3.5~5.5。表 5-4 为溶酶体含有的几种主要酶类及其作用底物。但是，在每一个溶酶体中所含有的酶的种类却是有限的，不同溶酶体中所含有的水解酶亦并非完全相同。也因此而使它们表现出不同的生化或生理性质。总而言之，溶酶体在其形态大小、数量分布、生理生化性质等各方面都表现出了高度的异质性（heterogenous）。

表 5-4　溶酶体含有的主要酶类及其作用底物

酶的种类	作用底物
内肽酶　外肽酶　胶原酶　顶体酶	多肽链
糖胺酶　糖基化酶	糖蛋白
磷蛋白磷酸化酶	磷蛋白
酸性麦芽糖酶	糖原
内糖苷酶　外糖苷酶　溶菌酶　硫酸酶	蛋白聚糖
芳基硫酸酶 A　N-脂酰鞘胺醇酶　糖苷酶	糖脂
三酰甘油酯酶　胆碱酯酶	神经脂
磷脂酶　磷酸二酯酶	磷脂
核酸酶　核苷酸酶　核苷酸硫酸化酶　焦磷酸酶	核酸与核苷酸

（二）溶酶体的共同特征是含有酸性水解酶

尽管溶酶体是一种具有高度异质性的细胞器，但是却也具有许多重要的共性特征：

（1）所有的溶酶体都是由一层单位膜包裹而成的囊球状结构小体；

（2）均含有丰富的酸性水解酶，包括蛋白酶、核酸酶、脂酶、糖苷酶、磷酸酶和溶菌酶等多种酶类。其中，酸性磷酸酶是溶酶体的标志酶；

（3）溶酶体膜中富含两种高度糖基化的跨膜整合蛋白 lgpA 和 lgpB。它们分布在溶酶体膜腔面，可能有利于防止溶酶体所含的酸性水解酶对其自身膜结构的消化分解；

（4）溶酶体膜上嵌有质子泵，可依赖水解 ATP 释放出的能量将 H^+逆浓度梯度地泵入溶酶体中，以形成和维持溶酶体囊腔中酸性的内环境。

（三）溶酶体膜糖蛋白家族具有高度同源性

近期有研究报道，在多种脊椎动物中鉴定出了一个溶酶体膜糖蛋白家族——溶酶体结合膜蛋白（lysosomal-associated membrane protein，LAMP）或溶酶体整合膜蛋白（lysosomal integral membrane protein，LIMP）。该类蛋白的肽链组成结构包括：一个较短的 N-端信号肽序列、一个高度糖基化的腔内区、一个单次跨膜区和一个由 10 个左右的氨基酸残基组成的 C-端胞质尾区。相关的蛋白质克隆实验表明，在不同物种的同类蛋白质及同一物种的不同蛋白质之间，特别是在其功能结构区，具有高度的氨基酸序列组成同源性。

在典型的溶酶体膜糖蛋白结构的糖基化蛋白核心，连接于蛋白质多肽链中天冬酰胺上的寡糖成分可占到糖蛋白重量的 50%；在寡糖链的末端均含有唾液酸。这种高度的糖基化使得蛋白质的等电点极低而呈酸性。

溶酶体整合膜蛋白高度保守的 C-端胞质尾区区段可能是该类蛋白从高尔基复合体向溶酶体运输的通用识别信号。因为，如果改变或破坏 C-端的结构组成，就会阻止它们向溶酶体的定向转运。这也提示：N-糖基化并非是这些蛋白质必需的转运信号。

二、溶酶体的类型

关于溶酶体类型的划分，目前存在两种不同的分类体系，在此分别介绍如下。

（一）溶酶体以其功能状态的不同可区分为三种基本类型

根据溶酶体的不同发育阶段和生理功能状态，一般将之划分为初级溶酶体、次级溶酶体和三级溶酶体三种基本类型。

1. 初级溶酶体　初级溶酶体（primary lysosome）是指通过其形成途径刚刚产生的溶酶体。所以，也有原溶酶体（proto-lysosome）、前溶酶体（prelysosome）之称。

初级溶酶体膜厚约 6nm，在形态上一般为不含有明显颗粒物质的透明圆球状。但是，在不同的细胞类型，或者在同一细胞类型的不同发育时期，可呈现为电子致密度较高的颗粒小体或带有棘突的小泡。初级溶酶体囊腔中的酶通常处于非活性状态，因此也有人称之为无活性溶酶体（inactive lysosome）。

2. 次级溶酶体　当初级溶酶体经过成熟，接受来自细胞内、外的物质，并与之发生相互作用时，即成为次级溶酶体（secondary lysosome）。因此，所谓的次级溶酶体，实质上是溶酶体的一种功能作用状态，故又被称作消化泡（digestive vacuole）。

次级溶酶体体积较大，外型多不规则，囊腔中含有正在被消化分解的物质颗粒或残损的膜碎片。依据次级溶酶体中所含作用底物之性质和来源的不同，又把次级溶酶体分为不同的类型，给予不同的称谓：

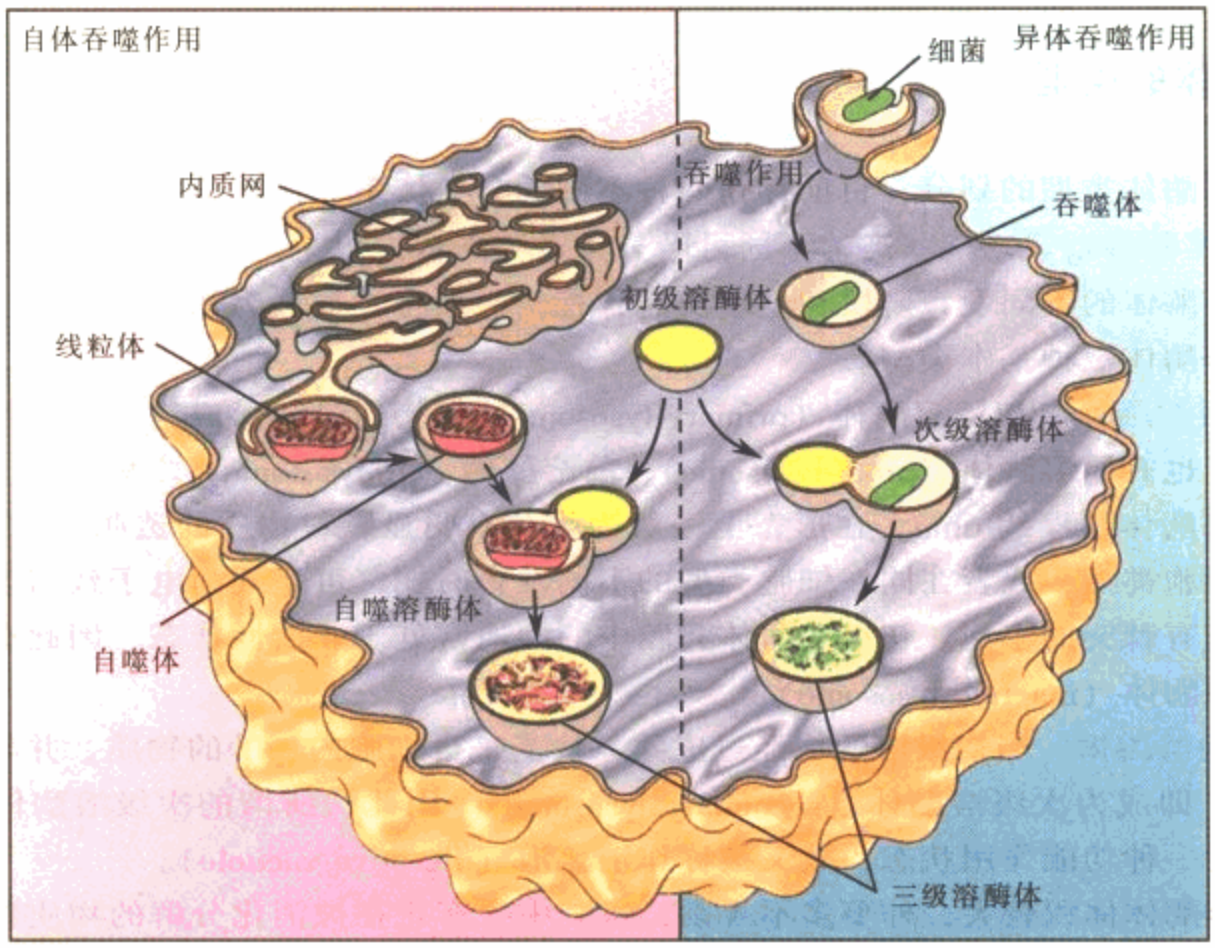
次级溶酶体如果是由初级溶酶体与吞噬体融合所成，就称之为吞噬溶酶体（phagolysosome）；倘若是由初级溶酶体和吞饮体融合而成，则被称作多泡小体（multivesicular body）。

无论是吞噬溶酶体或者是多泡小体，如果其中所包含的作用底物是来自于细胞自身的各种组分，或者衰老、残损和破碎的细胞器，统称之为自噬溶酶体（autophagolysosome）或自体吞噬泡（autophagic vacuoles）；如果作用底物是源于细胞外来的物质，则统称之为吞（或异）噬性溶酶体（phagolysosome）或者异体吞噬泡（heterophagic vacuole）。

3. 三级溶酶体　三级溶酶体（tertiary lysosome）又称后溶酶体（post-lysosome）。次级溶酶体在完成对绝大部分作用底物的消化、分解作用之后，尚会有一些不能被消化、分解的物质残留于其中。随着酶活性的逐渐降低以至最终消失，进入了溶酶体生理功能作用的终末状态。此时即又被易名为三级溶酶体或后溶酶体。也有人称之为残留小体（residual body）或终末溶酶体（telolysosome）。这些残留小体，有些可通过细胞的排遗作用，以胞吐的方式被清除、释放到细胞外去；有些则可能会沉积于细胞内而不被外排。例如，常见于脊椎动物和人类神经细胞、肝细胞、心肌细胞内的脂褐质（lipofuscin）；见于肿瘤细胞、某些病毒感染细胞、大肺泡细胞和单核吞噬细胞中的髓样结构（myelin figure）及含铁小体（siderosome）。它们会随个体年龄的增长而在细胞中累积。

不同的残留小体，不仅形态差异明显，而且也有不同的内含残留物质。脂褐质是由单位膜包裹的非规则形态小体，内含脂滴和电子密度不等的深色调物质。含铁小体内部充满电子密度较高的含铁颗粒，颗粒直径约为 50~60nm。当机体摄入大量铁质时，在肝、肾等器官组织的巨噬细胞中常会出现许多含铁小体。髓样结构之大小差异在 0.3~3μm 之间。其最显著的特征是内含呈板层状、指纹状或同心层状排列的膜性物质。

溶酶体的类型是相对于溶酶体的功能状态而人为划分的；不同的溶酶体类型，只是同一种功能结构不同功能状态的转换形式。图 5-7 表示溶酶体系统的这种功能类型转换关系。



●图 5-7　溶酶体功能类型转换关系示意图

（二）溶酶体以其形成过程的不同可区分为两大类型

近年来，基于对溶酶体形成过程的认识，又有人提出了新的溶酶体分类体系。根据这一分类体系，溶酶体被划分为内体性溶酶体（endolysosome）和吞噬性溶酶体两大类型。前者，被认为是由高尔基复合体芽生的运输小泡和经由细胞胞吞（饮）作用形成的内体（endosome）合并而成；后者则是由内体性溶酶体与来自胞内外的作用底物相互融合而成。

三、溶酶体形成与成熟过程

（一）内体性溶酶体是由运输小泡和内体合并形成的

溶酶体的形成是一个有内质网和高尔基复合体共同参与，集胞内物质合成加工、包装、运输及结构转化为一体的复杂而有序的过程。就目前的普遍认识，以溶酶体酶蛋白在附着型多聚核糖体上的合成为起始，内体性溶酶体的形成主要经历以下几个大的阶段：

1. 酶蛋白的 N-糖基化与内质网转运　合成的酶蛋白前体进入内质网网腔，经过加工、修饰，形成 N-连接的甘露糖糖蛋白；再被内质网以出芽的形式包裹形成膜性小泡，转送运输到高尔基复合体的形成面。

2. 酶蛋白在高尔基复合体内的加工与转移　在高尔基复合体形成面囊腔内磷酸转移酶与 N-乙酰葡萄糖胺磷酸糖苷酶的催化下，寡糖链上的甘露糖残基磷酸化形成甘露糖-6-磷酸（mannose-6-phosphate，M-6-P），此乃溶酶体水解酶分选的重要识别信号。

3. 酶蛋白的分选与转运　当带有 M-6-P 标记的溶酶体水解酶前体到达高尔基复合体成熟面时，被高尔基复合体网膜囊腔面的受体蛋白所识别、结合，随即触发高尔基复合体局部出芽和网膜外胞质面网格蛋白的组装，并最终以表面覆有网格蛋白包涵素被（clathrin coat）的有被小泡形式与高尔基复合体囊膜断离。

以 M-6-P 为标志的溶酶体酶分选机制是目前了解比较清楚的一条途径，但并非溶酶体酶分选的惟一途径。有实验提示，在某些细胞中可能还存在着非 M-6-P 依赖的其他分选

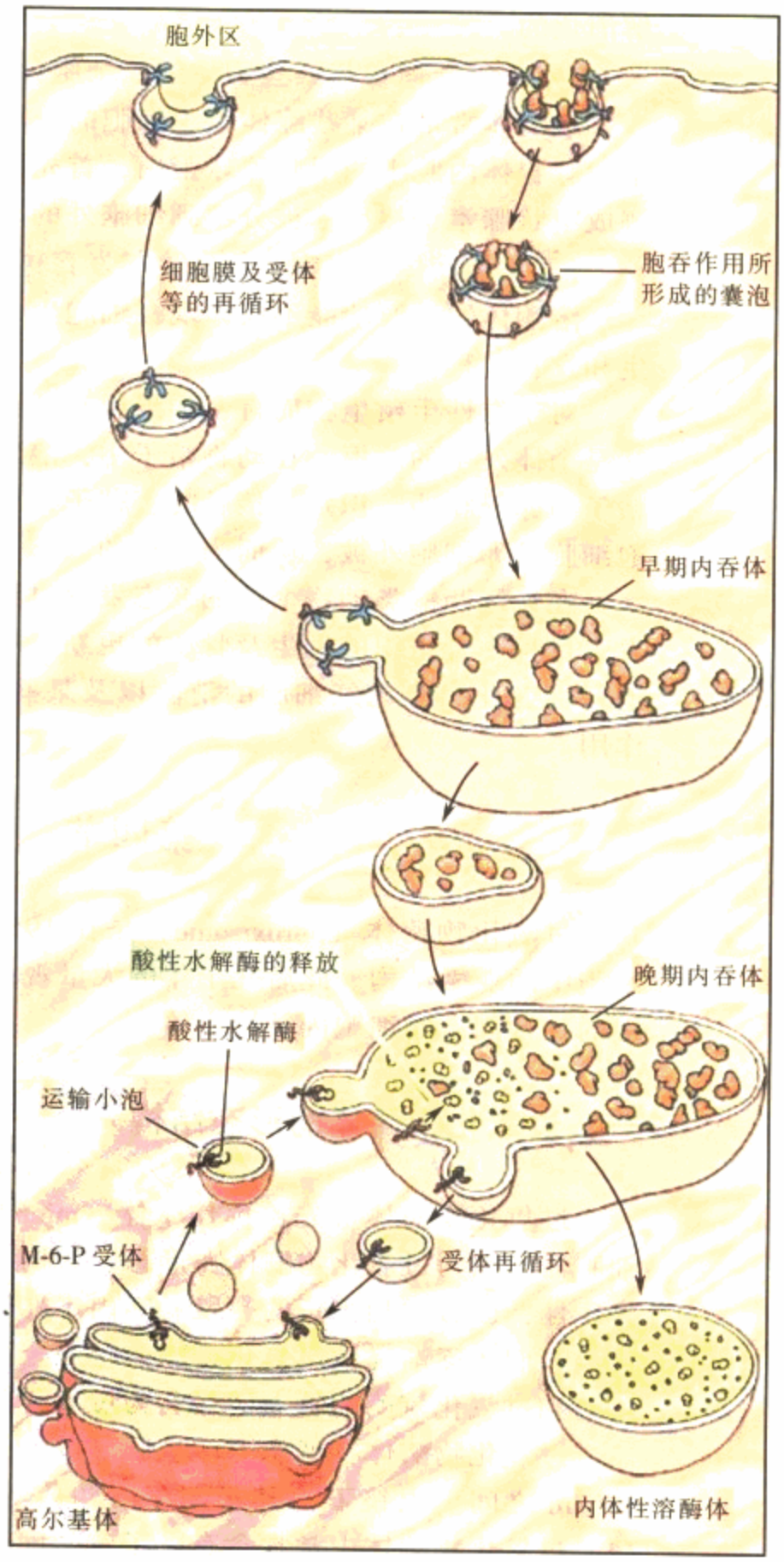
机制。

4. 前溶酶体的形成　断离后的有被小泡，很快脱去网格蛋白外被形成表面光滑的无被运输小泡。它们与胞内晚期内吞体（late endosome）融合，形成前溶酶体，也即所谓的内体性溶酶体。

所谓胞内内吞体，是由细胞的胞吞作用形成的一类异质性膜泡。晚期内吞体是相对于早期内吞体（early endosome）而言。在最初形成的早期内吞体囊腔中，是一个 pH 和细胞外液大致相当的碱性内环境。当这些早期内吞体与其他胞内小泡发生融合后，即为晚期内吞体。

5. 溶酶体的成熟　在前溶酶体膜上质子泵的作用下，胞质中 H^+的泵入，使其腔内 pH 从 7.4 左右下降到 6.0 左右。在改变了的酸性内环境条件下，溶酶体酶前体从与之结合的 M-6-P 膜受体上解离，并通过去磷酸化而成熟；与之同时，膜 M-6-P 受体则以出芽形成运输小泡的形式，重新回到高尔基复合体成熟面的网膜上。

内体性溶酶体的发生形成过程如图 5-8 所示。



●图 5-8　内体性溶酶体的形成过程示意图

（二）吞噬性溶酶体是内体性溶酶体与来源于胞内外的作用底物融合形成的

关于吞噬性溶酶体的发生机制、形成过程及其依据作用底物来源之不同而进行的次级类型划分，现存的两种分类命名体系是完全一致的，在溶酶体的功能分类体系中已经作了较为详细的介绍，此处不再赘述。

四、溶酶体的功能

溶酶体内含 60 多种酸性水解酶，具有对几乎所有生物分子的强大消化分解能力。溶酶体的一切细胞生物学功能，无不建立在这种对物质的消化和分解作用基础之上。

（一）溶酶体能够分解胞内的外来物质及清除衰老、残损的细胞器

溶酶体能够通过形成异噬性溶酶体和自噬性溶酶体的不同途径，及时地对经胞吞（饮）作用摄入的外来物质或细胞内衰老、残损的细胞器进行消化，使之分解成为可被细胞重新利用的小分子物质，透过溶酶体膜释放到细胞质基质，参与细胞的物质代谢。这不仅使可能影响细胞正常生命活动的外来异物和丧失了功能的衰老、残损的细胞器得以清除，有效地保证了细胞内环境的相对稳定，也有利于细胞器的更新替代。

（二）溶酶体具有物质消化与细胞营养功能

溶酶体作为细胞内消化的细胞器，在细胞饥饿状态下，可通过分解细胞内的一些对于细胞生存并非必需的生物大分子物质，为细胞的生命活动提供营养和能量，维持细胞的基本生存。事实上，在原生动物，其从外界摄入的各种营养物质，就是完全依赖溶酶体的分解消化作用才被细胞有机体吸收利用的。

（三）溶酶体是机体防御保护功能的组成部分

细胞防御是机体免疫防御系统的重要组成部分，而溶酶体强大的物质消化和分解能力则是防御细胞实现其免疫防御功能的基本保证和基本机制。通常，在巨噬细胞中均具有发达的溶酶体，被吞噬的细菌或病毒颗粒，最终都是在溶酶体的作用下而得以杀灭，并被分解消化的。

（四）溶酶体参与某些腺体组织细胞分泌过程的调节

溶酶体常常在某些腺体组织细胞的分泌活动过程中发挥着重要的作用。例如，储存于甲状腺腺体内腔中的甲状腺球蛋白，首先要通过吞噬作用进入分泌细胞内，在溶酶体中水解成甲状腺素，然后才被分泌到细胞外的。

（五）溶酶体在生物个体发生与发育过程中起重要作用

溶酶体的重要功能不仅体现在细胞生命活动之始终，而且也体现于整个生物个体的发生和发育过程。

对于有性生殖生物而言，如果说受精卵是生命个体发育的开始，那么生殖配子的形成就是个体发生的前提。在动物精子中，溶酶体特化为其头部最前端的顶体（acrosome），当精子与卵子相遇、识别、接触时，精子释放顶体中的水解酶，溶解、消化围绕卵细胞的滤泡细胞及卵细胞外被，从而为精核的入卵受精打开一条通道。

在无尾两栖类动物个体的变态发育过程中，其幼体尾巴的退化、吸收；脊椎动物生长发育过程中骨组织的发生及骨质的更新；哺乳动物子宫内膜的周期性萎缩、断乳后乳腺的退行性变化、衰老红细胞的清除以及某些特定的细胞编程性死亡等，都离不开溶酶体的作用。

第四节　过氧化物酶体

过氧化物酶体（peroxisome）是在 1954 年由 J. Rhodin 首次发现于鼠肾脏肾小管上皮细胞中的亚微结构。此后几十年的大量观察研究表明，该结构是普遍地存在于各类细胞之中的一种固有的细胞内结构小体。

一、过氧化物酶体的形态结构

过氧化物酶体最先被称作微体（microbody），也是由一层单位膜包裹而成的膜性结构细胞器。因为过氧化物酶体在形态、结构和物质降解功能上与溶酶体的类似以及其本身的异质性，以致在相当长的一段时间内不能够把它们与溶酶体区分开来。直至 20 世纪 70 年代，人们才逐渐确认过氧化物酶体是完全不同于溶酶体的另一种细胞器，并根据其内含氧化酶和过氧化氢酶的特点而命名为过氧化物酶体。

过氧化物酶体在形态上多呈圆形或卵圆形，偶见半月形和长方形；其直径变化在 0.2~1.7μm 之间。电镜下，其不同于溶酶体等类似的膜泡结构小体的最为突出的特征有二：（1）过氧化物酶体中常常含有电子致密度较高、排列规则的晶格结构。此乃尿酸氧化酶所形成，被称作类核体（nucleoid）或类晶体（crystalloid）。（2）在过氧化物酶体界膜内表面

可见一条称之为边缘板（marginal plate）的高电子致密度条带状结构。该结构的位置与过氧化物酶体的形态有关：如果存在于一侧，过氧化物酶体会呈半月形；倘若分布在两侧，过氧化物酶体则为长方形。

二、过氧化物酶体的酶类组成

过氧化物酶体的异质性不仅表现为形态、大小的多样性，而且也体现于不同的过氧化物酶体所含酶类及其生理功能的不同。迄今为止，已经鉴定的过氧化物酶体酶就多达 40 余种，但是至今尚未发现一种过氧化物酶体含有全部 40 多种酶。根据不同酶的作用性质，可把过氧化物酶大体上分为三类：

1. 氧化酶类　包括尿酸氧化酶、D-氨基酸氧化酶、L-氨基酸氧化酶、L-α 氨基酸氧化酶等黄素（FAD）依赖氧化酶类。各种氧化酶约占过氧化物酶体酶总量的 50%~60%。尽管各种氧化酶的作用底物互不相同，但是，它们共同的基本特征是：在对其作用底物的氧化过程中能够把氧还原成过氧化氢。这一反应通式可表示如下：

$$RH_2+O_2 \longrightarrow R+H_2O_2$$

2. 过氧化氢酶类　过氧化氢酶约占过氧化物酶体酶总量的 40%左右；因其几乎存在于各类细胞的过氧化物酶体中，故而被看作过氧化物酶体的标志性酶。该酶的作用是将过氧化氢分解成水和氧气，即：

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O+O_2$$

3. 过氧化物酶类　过氧化物酶可能仅存在于如血细胞等少数几种细胞类型的过氧化物酶体之中。其作用与过氧化氢酶相同，即可催化过氧化氢生成水和氧气。

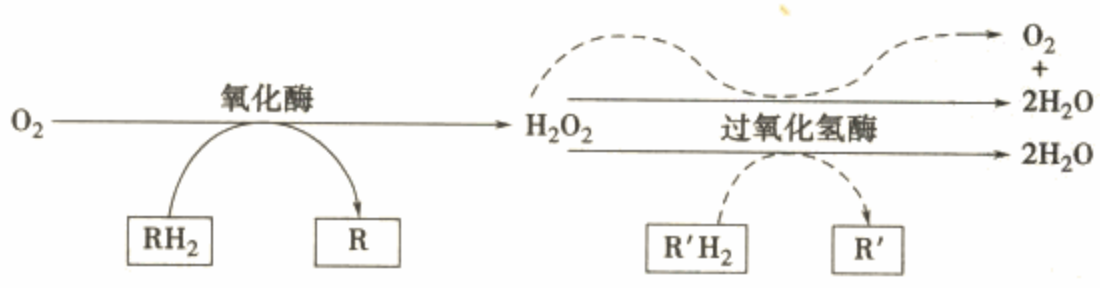
此外，在过氧化物酶体中还含有苹果酸脱氢酶、柠檬酸脱氢酶等。

三、过氧化物酶体的功能

（一）过氧化物酶体能有效地清除细胞代谢过程中产生的过氧化氢及其他毒性物质

过氧化物酶体中的氧化酶，可利用分子氧，通过氧化反应祛除特异有机底物上的氢原子，产生过氧化氢；而过氧化氢酶又能够利用过氧化氢去氧化诸如甲醛、甲酸、酚、醇等各种反应底物。

氧化酶与过氧化氢酶催化作用的耦联，形成了一个由过氧化氢协调的简单的呼吸链（图 5-9）。这不但是过氧化物酶体独有的重要特征之一，而且也是过氧化物酶体主要功能的体现，即可以有效地消除细胞代谢过程中产生的过氧化氢及其他毒性物质，从而起到对细胞的保护作用。这种反应类型，在肝、肾组织细胞中显得尤为重要。比如，饮酒进入人体的乙醇，主要就是通过此种方式被氧化解毒的。



●图 5-9　氧化酶与过氧化氢酶催化作用耦联的呼吸链

①在氧化酶的作用下，使底物 RH_2 将电子交给氧，生成过氧化氢（H_2O_2）；过氧化氢再被过氧化氢酶还原成水；②还原的电子来自多种小分子 RH_2 之一种（$R'H_2$）；③如果没有其他供体，则还原的电子可来自于过氧化氢本身

（二）过氧化物酶体能够有效地进行细胞氧张力的调节

尽管过氧化物酶体只占到细胞内氧耗量的20%，但是，其氧化能力却会随氧浓度的增高而增强。因此，即便细胞出现高浓度氧状态时，也会通过过氧化物酶体的强氧化作用而得以有效调节，以避免细胞遭受高浓度氧的损害。

（三）过氧化物酶体参与对细胞内脂肪酸等高能分子物质的分解转化

过氧化物酶体的另一功能是分解脂肪酸等高能分子，或使其转化为乙酰辅酶A，并被转运到细胞质基质，以备在生物合成反应中的再利用；或者向细胞直接提供热能。

四、过氧化物酶体的发生

关于过氧化物酶体的发生，目前存在两种不同的观点。

早期人们根据一些形态观察获得的实验资料，认为过氧化物酶体的发生和形成过程相似于溶酶体，即过氧化物酶体的酶蛋白是在糙面内质网上的附着核糖体合成，经过在内质网腔中的加工修饰后，以转运小泡的形式转移、分化形成的。

而现在则有证据显示：过氧化物酶体的发生与线粒体相类似，是由原有的过氧化物酶体分裂而来。分裂产生的子代过氧化物酶体经过进一步的装配，最后形成成熟的过氧化物酶体细胞器。更有实验证明：过氧化物酶体基质蛋白是合成于胞质中游离的核糖体上，然后，在其肽链某一端特定的过氧化物酶体蛋白分选信号序列（peroxisomal targeting signal，PTS）或导肽（leader peptide）的引导下进入到过氧化物酶体中的；过氧化物酶体膜整合蛋白也是在游离核糖体上合成的。

但是，无论上述哪种观点，都不排除和否认内质网在过氧化物酶体形成过程中的作用。首先，构成过氧化物酶体的膜脂，可能是在内质网上合成，再通过磷脂交换蛋白或膜泡运输的方式完成其转运的；其次，在胞质中游离核糖体上合成的过氧化物酶体膜整合蛋白，可能通过三种不同的途径嵌入过氧化物酶体的脂质膜中。这三种可能的途径分别是：①在过氧化物酶体进行分裂增殖之前直接嵌入；②嵌入来自于内质网的过氧化物酶体膜脂转移小泡，并随同转移小泡一起加入到过氧化物酶体；③嵌入正在从内质网膜上分化，但是又尚未完全分离的过氧化物酶体脂膜，然后与过氧化物酶体膜脂一起以转移小泡的形式被转运到过氧化物酶体。

第五节　囊泡与囊泡转运

囊泡（vesicle）是真核细胞中十分常见的膜泡结构。在所有具有内膜系统结构的细胞中，就必然地会有囊泡的形成，而囊泡形成，又都会伴随着细胞内物质的定向运输活动过程。

内膜系统是一个庞大复杂的功能结构体系，构成内膜系统的各主要细胞器都具有它们各自相对独特的结构存在形式和主要的生理功能。囊泡虽然不像内质网、高尔基复合体、溶酶体和过氧化物酶体那样作为一种相对稳定的细胞内固有结构而存在，但是却依然是细胞内膜系统不可或缺的重要功能结构组分。囊泡运输是真核细胞特有的一种细胞物质内外转运形式。囊泡类型多样，结构特殊，有着十分精密复杂的产生、形成过程。在细胞生命活动中由之所承载和往返穿梭进行的物质运输，不但涉及到蛋白质的修饰、加工和装配，同时还涉及到内膜系统不同功能结构间通过相互转换的定向物质转运过程及其复杂有效的分子调控机制。近些年来，对于囊泡的研究，受到了人们越来越多的关注。

一、囊泡的来源与类型

囊泡虽然可被视为是内膜系统重要的整体功能结构组分之一，但是与内质网、高尔基复合体、溶酶体及过氧化物酶体等膜性细胞器不同，它们并非是一种相对稳定的细胞内固有结构，而只是细胞内物质定向运输的载体和功能表现形式。据研究推测，承担细胞内物质定向运输的囊泡类型至少有 10 种以上。其中网格蛋白有被囊泡（clathrin-coated vesicle）、COP Ⅰ（coatmer-protein subunits Ⅰ）和 COP Ⅱ有被囊泡是目前了解较多的三种囊泡类型。

（一）网格蛋白有被囊泡产生于高尔基复合体及细胞膜

网格蛋白有被囊泡可产生于高尔基复合体，也可由细胞膜受体介导的细胞内吞作用而形成。由高尔基复合体产生的网格蛋白囊泡，主要介导从高尔基复合体向溶酶体、胞内体或质膜外的物质输送转运；而通过细胞内吞作用形成的网格蛋白囊泡则是将外来物质转送到细胞质，或者从胞内体输送到溶酶体。

网格蛋白有被小泡直径一般在 50~100nm 之间。该类囊泡的结构特点有两个：一是外被以由网格蛋白纤维构成的网架结构，亦因此而得名；二是在网格蛋白结构外框与囊膜之间约 20nm 的间隙中填充覆盖着大量的衔接蛋白（adaptor）。

衔接蛋白一方面形成相对于外侧网格蛋白框架而言囊泡的内壳结构，另一方面还介导网格蛋白与囊膜跨膜蛋白受体的连接，从而形成和维系了网格蛋白-囊泡的一体化结构体系。目前已经发现的衔接蛋白有 4 种，它们选择性地通过与不同受体-转运分子复合体的结合，形成特定的转运囊泡，进行不同的物质转运。这种复杂的相互作用结果，还使得进入网格有被囊泡的被转运物质受到了浓缩。

网格蛋白有被囊泡的产生，是一个非常复杂的过程，涉及到多种因素的参与和作用。在囊泡的形成中，除网格蛋白与衔接蛋白之外，发动蛋白或缢断蛋白（dynamin）——细胞质中一种可结合并水解 GTP 的特殊蛋白质也具有极其重要的作用。动力素由 900 个氨基酸组成，在膜囊芽生形成时，动力素与 GTP 结合，并在外凸（或内凹）芽生膜囊的颈部聚合形成环状；随着其对 GTP 的水解，动力素环向心缢缩，直至囊泡断离形成。而一旦囊泡芽生形成，便会立即脱去网格蛋白外被，转化为无被转运小泡，开始其转运运行。

（二）COP Ⅱ有被囊泡产生于内质网

COP Ⅱ有被囊泡由粗面内质网所产生，属于非网格蛋白有被囊泡类型。最先被发现于酵母细胞粗面内质网与胞浆及 ATP 的共孵育实验。利用酵母细胞突变体进行研究鉴定，发现 COP Ⅱ外被蛋白由 5 种亚基组成。其中的 Sar 蛋白属于一种小的 GTP 结合蛋白，它可通过与 GTP 或 GDP 的结合，来调节囊泡外被的装配与去装配。Sar 蛋白亚基与 GDP 的结合，使之处于一种非活性状态；当取而代之与 GTP 结合时，Sar 蛋白就会被激活，并导致其结合于内质网膜，同时引发其他蛋白亚基组分在内质网膜上聚合、装配、出芽，随即断离形成 COP Ⅱ有被囊泡。

COP Ⅱ囊泡主要负责介导从内质网到高尔基复合体的物质转运。实验证明，应用 COP Ⅱ囊泡外被蛋白的抗体，能够有效地阻止内质网膜小泡的出芽。有人采用绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）标记示踪技术观察 COP Ⅱ有被囊泡的转运途径发现：当 COP Ⅱ囊泡在内质网生成之后，在向高尔基复合体的转移途中，常常数个彼此先行融合，形成所谓的“内质网-高尔基体中间体”（ER-to-Golgi intermediate compartment），然后再沿微管系统继续运行，最终到达高尔基复合体之顺面（形成面）。COP Ⅱ囊泡在抵达其靶标之后、与靶膜融合之前，即由结合的 GTP 水解，产生 Sar-GDP 复合物，促使囊泡

包被蛋白发生去装配，导致囊泡脱去衣被成为无被转运小泡。

COPⅡ囊泡的物质转运具有选择性。实现这种选择的机制是：COPⅡ蛋白能够识别结合内质网跨膜蛋白受体胞质侧一端的信号序列；而内质网跨膜蛋白受体网腔侧的一端，则又与内质网网腔中的可溶性蛋白结合。由此可见，COPⅡ蛋白对于囊泡的选择性物质运输具有非常重要的作用。

（三）COPⅠ有被囊泡的主要功能是回收转运内质网逃逸蛋白

COPⅠ有被囊泡首先发现于高尔基复合体，亦属于非网格蛋白有被囊泡类型。它们主要负责内质网逃逸蛋白的捕捉、回收转运以及高尔基体膜内蛋白的逆向运输（retrograde transport）。同时，有证据表明，COPⅠ有被囊泡也能够行使从内质网到高尔基体的顺向转移（anterograde transport）。顺向转移一般不能直接完成，在囊泡的转移运行过程中，往往需要通过“内质网-高尔基体中间体”这一中间环节的中转。

COPⅠ外被蛋白覆盖于囊泡表面，也是一种由多个亚基组成的多聚体。在早前的研究中，人们用不能被水解的GTP类似物处理细胞，引起COPⅠ有被囊泡在细胞中的聚集。然后采用密度梯度离心技术，使之从细胞匀浆中分离出来。经鉴定分析，先后发现了COPⅠ有被囊泡外被蛋白的α、β、γ、δ、ε、ζ等几种蛋白亚基成分。其中的α蛋白（也称ARF蛋白）类似于COPⅡ中的Sar蛋白亚基，即作为一种GTP结合蛋白，可调节控制外被蛋白复合物的聚合、装配及膜泡的转运。

COPⅠ囊泡形成的大致过程是：（1）游离于胞质中的非活化状态ARF蛋白与GDP解离并与GTP结合形成GTP-ARF复合体；（2）GTP-ARF复合体作用于高尔基体膜上的ARF受体；（3）COPⅠ蛋白亚基聚合，同ARF一起与高尔基体囊膜表面其他相关蛋白结合作用，诱导转运囊泡芽生。而一旦COPⅠ有被囊泡从高尔基顺面膜囊生成断离出来，COPⅠ蛋白即可解离。体外实验证明：GTP的存在，是COPⅠ外被蛋白发生聚合与解离的必要条件。

二、囊泡转运

（一）囊泡转运是细胞物质定向运输的基本途径

无论何种类型的囊泡，其囊膜均来自于细胞器膜。囊泡的产生方式，是由细胞器膜外凸或内凹芽生（budding）而成。体外研究结果显示：囊泡的芽生是一个主动的自我装配过程；参与这一过程的各种组分，在进化上是十分保守的。因为，从酵母或植物细胞中提取的胞质溶胶，同样能够启动动物细胞中高尔基复合体的囊泡出芽生成。而所谓的囊泡转运（vesicular transport），则是指囊泡以出芽的方式，从一种细胞器膜产生、脱离后又定向地与另一种细胞器膜相互融合的过程。

囊泡的产生形成过程，总是伴随着物质的转运；囊泡的运行轨道及归宿，取决于其所转运物质的定位去向。比如，细胞通过胞吞作用摄入的各种外来物质，总是以囊泡的形式，自外而内，从细胞膜输送到胞内体或溶酶体。而在细胞内所合成产生的各种外输性蛋白及颗粒物质，总是先进入内质网，然后以囊泡的形式输送到高尔基体，再直接地或经由溶酶体到达细胞膜，最终通过胞吐作用（或出胞作用）分泌释放出去。由此可见，由囊泡转运所承载和介导的双向性物质运输，不仅是细胞内外物质交换和信号传递的一条重要途径，而且也是细胞物质定向运输的一种基本形式。

（二）囊泡转运是一个高度有序并受到严格选择和精密控制的物质运输过程

不同来源、不同类型的囊泡，承载和介导不同物质的定向运输。它们必须沿正确的路径，以特定的运行方式，方可抵达、锚泊于既定的靶标，并通过膜的融合释放其运载

物质。

一般认为，囊泡如果在较短距离内转运，其主要以简单弥散的方式运行，比如从内质网到高尔基体的囊泡转运就是通过这种方式进行的；当转运距离较长时，囊泡运行则需要有类似骨骼肌纤维中的运动蛋白协助才能完成。比如在一个长的神经细胞中，源于高尔基复合体的囊泡向细胞轴突远（末）端的转移就是如此。

囊泡转运不仅仅只是物质的简单输送，而且还是一个严格的质量检查、修饰加工过程。例如进入内质网的蛋白质，首先要被决定其去、留问题；之后，那些外输的蛋白质，往往还要经过一定的修饰、加工和质量检查，才能以囊泡的形式被转运到高尔基体。有时候，某些内质网驻留蛋白或不合格的外输蛋白可能会从内质网逃逸外流，但是，它们在进入高尔基体后也还是会被甄别、捕捉，并由 COP Ⅰ有被囊泡遣返回来。事实上，无论何种来源类型、哪些形式途径的囊泡转运，都是高度有序、受到严格选择和精密控制的物质运输过程。

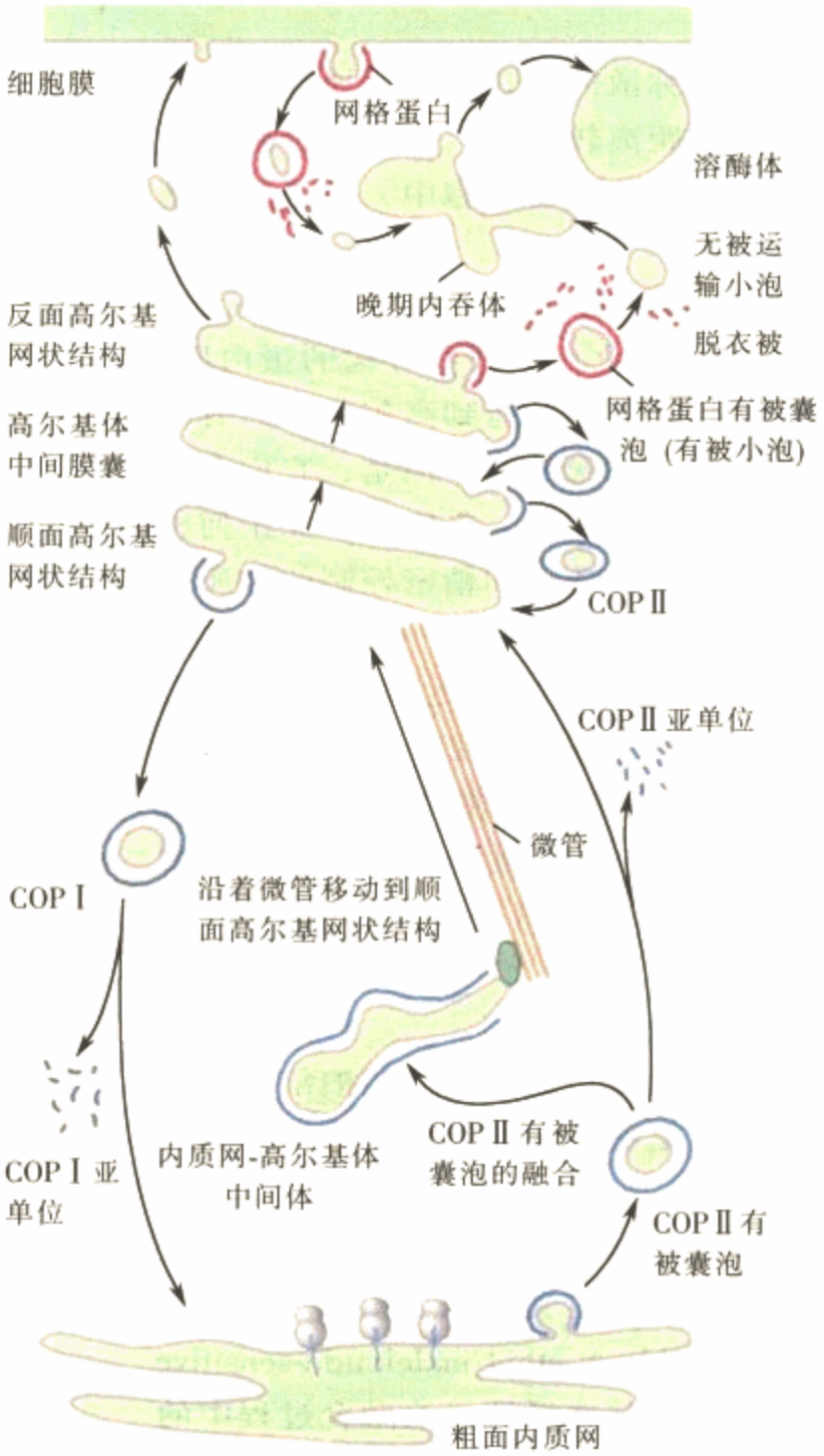
囊泡的转运过程极其复杂。迄今为止，在酵母细胞中发现至少有将近 30 种的基因与囊泡的转运相关。通过对其中已被分离的 *sec4* 基因碱基组成序列的研究分析表明，该基因编码一种与 Rab 同源的 GTP 结合蛋白，它在非网格蛋白有被囊泡的脱衣被转运融合过程中具有重要的调节作用。如果使 *sec4* 基因突变，非网格蛋白有被囊泡的脱衣被转运融合过程就会受阻失常。而转运融合前的脱衣被——衣被蛋白的解聚（depolymerization）则又是各种来源类型、不同运行去向囊泡转运的共同特点。

（三）特异性识别融合是囊泡物质定向转运和准确卸载的基本保证

转运囊泡抵达靶标之后与靶膜的融合，是一个涉及到多种蛋白的识别与锚泊结合、装配与去装配的复杂调控过程，具有高度的特异性。而这也正是物质定向运输和准确卸载的基本保证机制。

囊泡与靶膜的识别是它们之间相互融合的前提。虽然目前对于这种识别的机制还知之甚少，但是，其无疑与囊泡表面的特异性标记分子和靶膜上的相应受体密切相关。近些年来，可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子接合蛋白受体（soluble N-ethyl maleimide-sensitive factor attachment protein receptor，SNAREs）家族在囊泡运输及其选择性锚泊融合过程中的作用引起了人们的极大关注。囊泡相关膜蛋白（vesicle-associated membrane protein，VAMP）和联接蛋白（syntaxin）是该蛋白家族的一对成员，负责介导细胞内的囊泡转运。业已发现：在转运囊泡表面有一种 VAMP 类似蛋白，被称之为囊泡 SNAREs（vesicle-SNAREs，v-SNAREs）；联接蛋白是存在于靶标细胞器膜上 SNAREs 的对应序列，被称之为靶 SNAREs（target-SNAREs，t-SNAREs）。此二者互为识别，特异互补。据此可以推测：也许正是通过它们之间那种“锁-钥”契合式的相互作用，决定着囊泡的锚泊与融合。事实上，存在于神经元突触前质膜上的联接蛋白和能够与之特异性结合的突触小泡膜上的囊泡相关膜蛋白已被分离鉴定。这两种蛋白的相互作用，可介导膜的融合和神经递质的释放。目前普遍认为：所有转运囊泡以及细胞器膜上都带有各自特有的一套 SNAREs 互补序列，它们之间高度特异的相互识别和相互作用，是使转运囊泡得以在靶膜上锚泊停靠，保证囊泡物质定向运输和准确卸载的基本分子机制之一。迄今为止，分离、鉴定，并且进行了细胞内定位的这两类蛋白家族成员已有 10 余种。

此外，还发现了包括一个大的 GTP 结合蛋白家族（Rab 蛋白家族）在内的多种参与囊泡转运识别、锚泊融合调节的蛋白因子。比如，合成于细胞质中的融合蛋白（fusion protein），其可在囊泡与靶膜融合处与 SNAREs 一起组装成为融合复合物（fusion complex），促使囊泡的锚泊停靠，催化融合的发生。据报道，融合蛋白的主要作用是减少因去除囊泡与靶膜融合点之间的吸附在膜亲水面的水分子而造成的能量消耗。



●图 5-10　由囊泡转运介导的细胞内膜流示意图

（四）囊泡转运是实现细胞膜及内膜系统功能结构转换和代谢更新的桥梁

细胞膜和内质网是囊泡转运的主要发源地，而高尔基复合体则构成了囊泡转运的集散中心。伴随物质的合成运输，由内质网产生的转运囊泡融汇到高尔基复合体，其囊膜成为高尔基形成面膜的一部分；由高尔基体成熟面持续地产生和分化出的不同分泌囊泡，或被直接输送到细胞膜，或经由溶酶体最终流向和融入细胞膜。细胞膜来源的囊泡转运，则以胞内体或吞噬（饮）体的形式与溶酶体发生融合转换。由此可见，不断地产生、形成，存在和穿梭于质膜及内膜系统结构之间的囊泡转运，它们在承载和介导细胞物质定向运输功能的同时，又不断地被融汇更替、转换易名，从一种细胞器膜到另一种细胞器膜，形成了一个有条不紊、源源不断的膜流（图 5-10），并以此进行着细胞膜及内膜系统不同功能结构之间的相互转换与代谢更新。

第六节　细胞内膜系统与医学的关系

早在 1858 年，当时的病理学家 R. Virchow 就提出了病理过程是进行于细胞和组织之中的著名论断。作为生命的基本单位，细胞生命活动现象，是其内部各种功能结构生理状况的综合体现。反之，细胞内部各种功能结构的生理状态，也必然会影响到细胞的总体生命活动；它们的任何异常，都会直接引起细胞生命活动的紊乱或导致细胞的病理改变。内膜系统是真核细胞内最为重要的功能结构体系之一，因此，也就毫不例外地和细胞的一系列病理过程以及多种人类疾病密切相关。内膜系统，不仅是细胞生物学自身研究的主要课题，而且也是现代医学科学研究的重大问题之一。

一、内质网的病理变化

内质网是极为敏感的细胞器，许多不良因素都可能会引起内质网形态、结构的改变，并导致其功能的异常。

（一）内质网最常见的病理改变是肿胀、肥大或囊池塌陷

内质网的肿胀主要是由于钠离子和水分的渗入、内流所造成的一种水解变性。在低氧、辐射、阻塞等情况下，也会引起肿胀的发生。极度的肿胀，最终会导致内质网的破裂。

由低氧、病毒性肝炎引起的粗面内质网的肿胀，还常常伴随着附着核糖体颗粒的脱落和萎缩。

膜的过氧化损伤所致的合成障碍造成的内质网改变往往表现为内质网囊池的塌陷；而肝细胞在Ⅰ型糖原累积病及恶性营养不良综合征时，则表现为内质网膜断离伴随核糖体脱

落的典型形态改变。

（二）内质网囊腔中包含物的形成和出现是某些疾病或病理过程的表现特征

在药物中毒、肿瘤所致的代谢障碍情况下，可观察到一些有形或无形的包含物在内质网中的形成出现；而在某些遗传性疾病患者，由于内质网合成蛋白质的分子结构异常，则有蛋白质、糖原和脂类物质在内质网中的累积。

（三）内质网在不同肿瘤细胞中呈现多样性的改变

内质网是细胞生理功能特性的敏感指标。在具有不同生物学特性的癌变细胞中，内质网的形态结构与功能也呈现出多样性的改变。通常，在低分化癌变细胞中，内质网比较稀少；在高分化癌变细胞中，其比较丰富发达的内质网遍布细胞质中。低侵袭力癌细胞中内质网较少，葡萄糖-6-磷酸酶活性呈下降趋势，但是分泌蛋白、尿激酶合成相对明显增多；高侵袭癌细胞中，内质网相对发达，分泌蛋白、驻留蛋白、β-葡萄糖醛酸苷酶等的合成均比低侵袭癌细胞显著增高。

有人认为，孔环片层也是肿瘤细胞中常见的内质网改变，但是关于孔环片层的来源却还存在不同的看法。有学者认为，孔环片层是内质网的异型结构形态；另有学者认为，孔环片层是核膜的特化结构。

二、高尔基复合体的病理形态变化

（一）功能亢进导致高尔基体的代偿性肥大

当细胞分泌功能亢进时，往往伴随高尔基体结构的肥大。有人在大鼠肾上腺皮质的再生实验中注意到：再生过程中，腺垂体细胞分泌促肾上腺皮质激素的高尔基体处于旺盛分泌状态时，其整个结构显著增大；再生结束后，随着促肾上腺皮质激素分泌的减少，其高尔基体结构又恢复到常态。

（二）毒性物质作用导致高尔基体的萎缩与损坏

脂肪肝的形成，是由于乙醇等毒性物质的作用，造成肝细胞中高尔基体脂蛋白正常合成分泌功能的丧失所致。在这种病理状态下，可观察到，肝细胞高尔基体中脂蛋白颗粒明显减少甚至消失；高尔基体自身形态萎缩，结构受到破坏。

（三）肿瘤细胞分化状态影响高尔基复合体形态

正常情况下，在分化成熟、分泌活动旺盛的细胞中高尔基体较为发达，而在尚未分化成熟或处于生长发育阶段的细胞中，高尔基体则相对较少。通过对各种不同肿瘤细胞的大量观察研究结果表明，高尔基体在肿瘤细胞中的数量分布、形态结构以及发达程度，也因肿瘤细胞的分化状态不同而呈现显著差异。例如，在低分化的大肠癌细胞中，高尔基体仅为聚集、分布在细胞核周围的一些分泌小泡；而在高分化的大肠癌细胞中，高尔基体则特别发达，具有典型的高尔基体形态结构。

三、溶酶体与疾病

溶酶体在细胞生命活动中具有多方面的重要生物学功能。通常把由于溶酶体的结构或功能异常所引起的疾病统称为溶酶体病。近些年来，人们对于溶酶体与人类某些疾病的关系，进行了颇为广泛深入的探讨和研究，也取得了一定的成果。

（一）溶酶体酶缺乏或缺陷疾病多为一些先天性疾病

目前已经发现有 40 余种先天性溶酶体病系由溶酶体中某些酶的缺乏或缺陷所引起。现举两例简单介绍如下：

1. 泰-萨氏病　泰-萨氏病（Tay-Sachs disease）亦称黑蒙性痴呆。由于患者缺乏氨基己糖酶 A，阻断了 GM2 神经节苷脂的代谢，导致了 GM2 的代谢障碍，使得在脑及神经系统和心脏、肝脏等组织的大量累积所致。

2. Ⅱ型糖原累积病　Ⅱ型糖原累积病（type Ⅱ glycogenosis，Pompe's disease）是由于缺乏 α-糖苷酶，以致糖原代谢受阻而沉积于全身多种组织。其主要受累器官组织有：脑、肝、肾、肾上腺、骨骼肌和心肌等。

此外，某些药物也会引起获得性溶酶体酶缺乏相关疾病。比如，磺胺类药物会造成巨噬细胞内 pH 的升高，使得酸化降低，导致所吞噬的细菌不能被有效地杀灭而引发炎症。还有，如抗疟疾、抗组胺及抗抑郁之类的药物，会因其在溶酶体中的蓄积，或引起某些细胞代谢中间产物在溶酶体中的蓄积，从而直接或间接地导致溶酶体病的发生。获得性溶酶体酶缺乏疾病是比较少见的。

（二）溶酶体酶的释放或外泄造成的细胞或组织损伤性疾病

由于受到某些理化或生物因素的影响，使得溶酶体膜的稳定性发生改变，导致酶的释放，结果造成细胞、组织的损伤或疾病。

1. 矽肺　矽肺是一种与溶酶体膜受损导致溶酶体酶释放有关的常见职业病。其发病机制是：吸入肺中的矽尘颗粒，被肺组织中的巨噬细胞吞噬，形成吞噬体；进而与内体性溶酶体（或初级溶酶体）融合为吞噬性溶酶体。带有负电荷的矽尘颗粒在溶酶体内形成矽酸分子，以非共价键与溶酶体膜受体或膜上的阳离子结合，影响到膜的稳定性，使得溶酶体酶和矽酸分子外泄，造成巨噬细胞的自溶。一方面，外泄的溶酶体酶消化和溶解周围的组织细胞；另一方面，释放出的不能被消化分解的矽尘颗粒又被巨噬细胞所吞噬，重复上述过程。结果诱导成纤维细胞增生，并分泌大量胶原物质，造成肺组织纤维化，降低肺的弹性，引起肺功能障碍甚至丧失。

2. 痛风　痛风是以高尿酸血症为主要临床生化指征的嘌呤代谢紊乱性疾病。当尿酸盐的生成与排除之间平衡失调、血尿酸盐升高时，尿酸盐会以结晶形式沉积于关节、关节周围及多种组织，并被白细胞所吞噬。被吞噬的尿酸盐结晶与溶酶体膜之间形成的氢键结合，改变了溶酶体膜的稳定性；溶酶体中水解酶和组胺等可致炎物质释放，在引起白细胞自溶坏死的同时，引发所在沉积组织的急性炎症。被释放的尿酸盐又继续在组织沉积。当沉积发生在关节、关节周围、滑囊、腱鞘等组织时，会形成异物性肉芽肿；而在肾脏，则可能导致尿酸性肾结石或慢性间质性肾炎。

此外，溶酶体酶的释放，与类风湿性关节炎疾病发生、休克发生后的细胞与机体的不可逆损伤等都有着密切的关系。

四、过氧化物酶体与疾病

（一）原发性过氧化物酶体缺陷所致的遗传性疾病

与原发性过氧化物酶体缺陷相关的大多是一些遗传性疾病。例如：

1. 遗传性无过氧化氢酶血症　该类患者细胞内过氧化氢酶缺乏，抗感染能力下降，易发口腔炎等疾病。

2. Zellweger 脑肝肾综合征　这是一种常染色体隐性遗传病。患者肝、肾细胞中过氧化物酶体及过氧化氢酶缺乏，琥珀酸脱氢酶-黄素蛋白与 CoQ 之间的电子传递障碍；临床表现为严重肝功能障碍、重度骨骼肌张力减退、脑发育迟缓及癫痫等综合症状。

（二）疾病过程中的过氧化物酶体的病理改变

过氧化物酶体的病理性改变可表现为数量、体积、形态等多种异常。比如，在患有甲

状腺功能亢进、慢性酒精中毒或慢性低氧症等疾病时，可见患者肝细胞中过氧化物酶体数量增多；而在甲状腺功能低下、肝脂肪变性或高脂血症等情况下，则过氧化物酶体数量减少、老化或发育不全。这也提示：甲状腺激素与过氧化物酶体的产生、形成和发育具有一定的关系。

过氧化物酶体数目、大小以及酶含量的超常变化亦常见于病毒、细菌及寄生虫感染、炎症或内毒素血症等病理情况以及肿瘤细胞中。

基质溶解是过氧化物酶体最为常见的异常形态学变化。其主要形式是：在过氧化物酶体内形成，出现片状、小管状结晶包涵物。此种改变往往发生于缺血性组织损伤。

小结

内膜系统是指细胞内那些在结构、功能，乃至发生起源上密切关联的细胞固有膜性结构细胞器，包括内质网、高尔基复合体、溶酶体、过氧化物酶体、各种转运小泡和核膜等。

内膜系统是细胞长期历史演化的产物和内部结构不断分化完善、生理功能逐渐提高的结果，也是真核细胞区别于原核细胞的重要标志之一。

内膜系统的出现，不仅有效地增加了细胞内有限空间的表面积，而且，使得细胞内不同的生理、生化过程能够彼此相对独立、互不干扰地在一定的区域中进行，从而极大地提高了细胞整体的代谢水平和功能效率。这就是所谓的房室性区域化效应。

内质网是以大小、形状各异的管、泡、或扁囊为基本结构单位构成的一个彼此相互连通的膜性管网系统。它在整体结构上可与高尔基复合体、溶酶体等内膜系统的其他组分移行转换；在功能上则与这些结构密切相关，并因此而在内膜系统中占据中心地位。

作为一种膜性结构，脂类和蛋白质是内质网的基本化学组成成分。与其复杂多样的功能相适应，内质网含有以葡萄糖-6-磷酸酶为主要标志的至少 30 多种以上的酶或酶系。

依据内质网不同的形态结构特征和主要的功能特性，可将之划分为粗面内质网和滑面内质网两种基本类型。

粗面内质网多呈排列较为整齐的扁平囊状，因其网膜胞质面有核糖体颗粒的附着而得名。其主要功能是：作为核糖体附着的支架，与外输性蛋白的分泌合成、修饰加工及转运过程密切相关。而信号肽则是指导蛋白质多肽链在粗面内质网上合成与穿越转移的决定因素。

滑面内质网多呈管、泡样网状结构，网膜表面因无核糖体颗粒的附着而较为平滑。常常可见与粗面内质网相互连通。滑面内质网是作为细胞内脂类物质合成主要场所的多功能细胞器。因此，在不同的细胞或同一细胞的不同生理时期，它可以具有不同的发达程度、不同的形态分布，并表现完全出不同的功能特性。

高尔基复合体是由三种不同大小类型的囊泡组成的膜性结构复合体。在其整体形态结构和化学特性上，均表现出明显的极性特征。高尔基复合体在不同的组织细胞或同一细胞的不同发育阶段和生理状况下，其分布、数量和发达程度都存在着较大的差异。

大量的实验分析表明：组成高尔基复合体的脂类、蛋白质成分的含量和复杂程度介于内质网和细胞膜之间。据此推断：高尔基复合体是构成质膜与内质网之间相互联系的一种过渡性细胞器。

糖基转移酶是高尔基复合体中最具特征性的标志酶。作为内膜系统的主要结构组成之一，高尔基复合体的功能主要体现为：对内质网来源的蛋白质的修饰加工；糖蛋白中多（寡）糖组分及分泌性多糖类的生物合成；和内膜系统其他结构组分一起构成了胞内物质转运的特殊通道，尤其是在细胞内蛋白质的分选和膜泡的定向运输中具有重要的枢纽作用。

溶酶体普遍地存在于各类组织细胞之中，系由一层单位膜包裹而成的膜性球囊状结构

细胞器。溶酶体在其形态大小、数量分布以及生理生化性质等各个方面，都表现出了高度的异质性。

含有丰富、多样的酸性水解酶，不仅是溶酶体最为显著的标志性特征，而且也是所有溶酶体的一般共性特征。

根据溶酶体的不同生理功能状态，可将之划分为初级溶酶体、次级溶酶体和三级溶酶体等三种基本类型。不同的溶酶体类型，只是同一种功能结构不同功能状态的转换形式。

基于溶酶体的形成过程，又可将之划分为内体性溶酶体和吞噬性溶酶体两大类型。前者被认为是由高尔基复合体芽生的运输小泡和经由细胞胞吞（饮）作用形成的内体合并而成；后者则是由内体性溶酶体与来自胞内外的作用底物相互融合而成。

溶酶体内含 60 多种酸性水解酶，具有强大的细胞内消化功能。

过氧化物酶体也是由一层单位膜包裹而成的膜性结构细胞器。并因其内含氧化酶和过氧化氢酶而得名。

过氧化氢酶约占过氧化物酶体酶总量的 40%，因其几乎存在于各类细胞的过氧化物酶体中，故被看作过氧化物酶体的标志性酶。

过氧化物酶体具有解毒、调节细胞氧张力以及参与脂肪酸等高能分子的分解等重要功能作用。

囊泡是真核细胞中十分常见的膜泡结构。它虽然不像内质网、高尔基复合体、溶酶体和过氧化物酶体那样作为一种相对稳定的细胞内固有结构而存在，但是却依然是细胞内膜系统不可或缺的重要功能结构组分和细胞内物质定向运输的载体和功能表现形式。

承担细胞内物质定向运输的囊泡类型至少有 10 种以上。网格蛋白有被囊泡、COPⅠ和COPⅡ有被囊泡是目前了解较多的三种囊泡类型。

网格蛋白有被囊泡可产生于高尔基复合体，也可由细胞膜受体介导的细胞内吞作用而形成。由高尔基复合体产生的网格蛋白囊泡，主要介导从高尔基复合体向溶酶体、胞内体或质膜外的物质输送转运；而通过细胞内吞作用形成的网格蛋白囊泡则是将外来物质转送到细胞质，或者从胞内体输送到溶酶体。

COPⅡ有被囊泡由粗面内质网所产生，主要负责介导从内质网到高尔基复合体的物质转运。

COPⅠ有被囊泡首先发现于高尔基复合体，它们主要负责内质网逃逸蛋白的捕捉、回收转运以及高尔基体膜内蛋白的逆向运输。同时，也能够行使从内质网到高尔基体的顺向转移。

无论何种类型的囊泡，其囊膜均来自于细胞器膜。囊泡的产生形成过程，总是伴随着物质的转运；囊泡的运行轨道及归宿，取决于其所转运物质的定位去向。由囊泡转运所承载和介导的双向性物质运输，不仅是细胞内外物质交换和信号传递的一条重要途径，而且也是细胞物质定向运输的一种基本形式。

不断地产生、形成，存在和穿梭于质膜及内膜系统结构之间的囊泡转运，它们在承载和介导细胞物质定向运输功能的同时，又不断地被融汇更替、转换易名，从一种细胞器膜到另一种细胞器膜，形成了一个有条不紊、源源不断的膜流，并以此进行着细胞膜及内膜系统不同功能结构之间的相互转换与代谢更新。

内膜系统是真核细胞内最为重要的功能结构体系之一，因此，也就毫不例外地和细胞的一系列病理过程以及多种人类疾病密切相关。

（宋土生）

第六章　线粒体与细胞的能量转换

地球上一切生命活动所需要的能量主要来源于太阳能。但不同类型的生物体吸收能量的机制不同，光能转变为化学能只发生在具有叶绿素的植物和一些有光合能力的细菌中，它们能通过光合作用，将无机物（如 CO_2 和 H_2O）转化成可被自身利用的有机物，这类生物是自养生物（autotroph）。而动物细胞不具叶绿体，它们以自养生物合成的有机物为营养，通过分解代谢而获得能量，因而被称为异养生物（heterotroph），而动物细胞实现这一能量转换的细胞内主要结构就是线粒体。

线粒体（单数 mitochondion；复数 mitochondria）是一个敏感而多变的细胞器，普遍存在于除哺乳动物成熟红细胞以外的所有真核细胞中。细胞生命活动所需能量的 80%是由线粒体提供的，所以它是细胞进行生物氧化和能量转换的主要场所，也有人将线粒体比喻为细胞的“动力工厂（power station）”。此外近年来的研究也显示，线粒体与细胞内氧自由基的生成、细胞死亡以及许多人类疾病的发生有密切的关系。

第一节　线粒体的基本特征

一、线粒体的形态、数量和结构

（一）线粒体的形态、数量与细胞的类型和生理状态有关

光镜下的线粒体呈线状、粒状或杆状等，直径 0.5~1.0μm。不同类型或不同生理状态的细胞，线粒体的形态、大小、数量及排列分布并不相同。例如，在低渗环境下，线粒体膨胀如泡状；在高渗环境下，线粒体又伸长为线状。线粒体的形态也随细胞发育阶段不同而异，如人胚肝细胞的线粒体，在发育早期为短棒状，在发育晚期为长棒状。细胞内的渗透压和 pH 对线粒体形态也有影响，酸性时线粒体膨胀，碱性时线粒体为粒状。

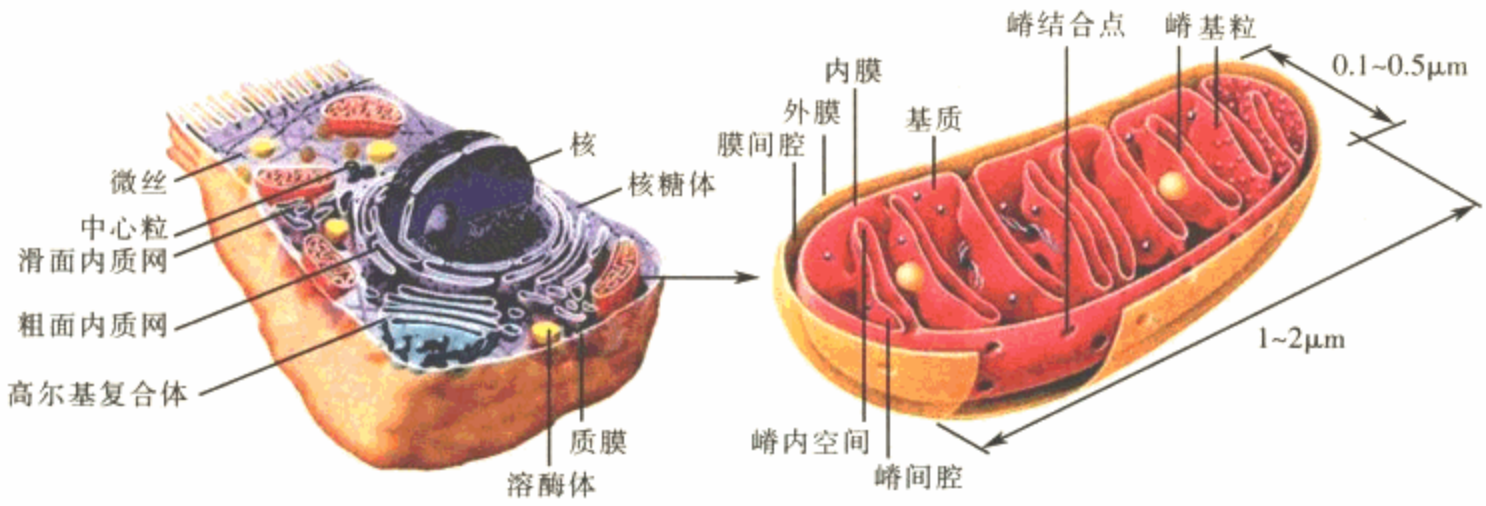
线粒体的数量可因细胞种类而不同，最少的细胞只含 1 个线粒体，最多的达 50 万个，其总体积可占细胞总体积的 25%。这与细胞本身的代谢活动有关，代谢旺盛时，线粒体数量较多，反之线粒体的数量则较少。

（二）线粒体是由双层单位膜套叠而成的封闭性膜囊结构

电镜下，线粒体是由双层单位膜套叠而成。两层膜将线粒体内部空间与细胞质隔离，并使线粒体内部空间分隔成两个膜性空间，组成线粒体结构的基本支架（图 6-1）。

1. 外膜　外膜（outer membrane）是线粒体最外层所包绕的一层单位膜，厚约 5~7nm，光滑平整。在组成上，外膜的 1/2 为脂类，1/2 为蛋白质。外膜的蛋白质包括多种转运蛋白，它们形成较大的水相通道跨越脂质双层，使外膜出现直径 2~3nm 的小孔，允许通过分子量在 10 000 以下的物质，包括一些小分子多肽。

2. 内膜　内膜（inner membrane）比外膜稍薄，平均厚 4.5nm，也是一层单位膜。内膜将线粒体的内部空间分成两部分，其中由内膜直接包围的空间称内腔，含有基质，也称基质腔（matrix space）；内膜与外膜之间的空间称为外腔，或膜间腔（intermembrane space）。内膜上有大量向内腔突起的折叠（infolding），形成嵴（cristae）。嵴与嵴之间的内腔部分称嵴间腔（intercristae space），而由于嵴向内腔突进造成的外腔向内伸入的部分称为嵴内空间（intracristae space）。内膜的化学组成中 20%是脂类，80%是蛋白质，蛋白质的含量明显高



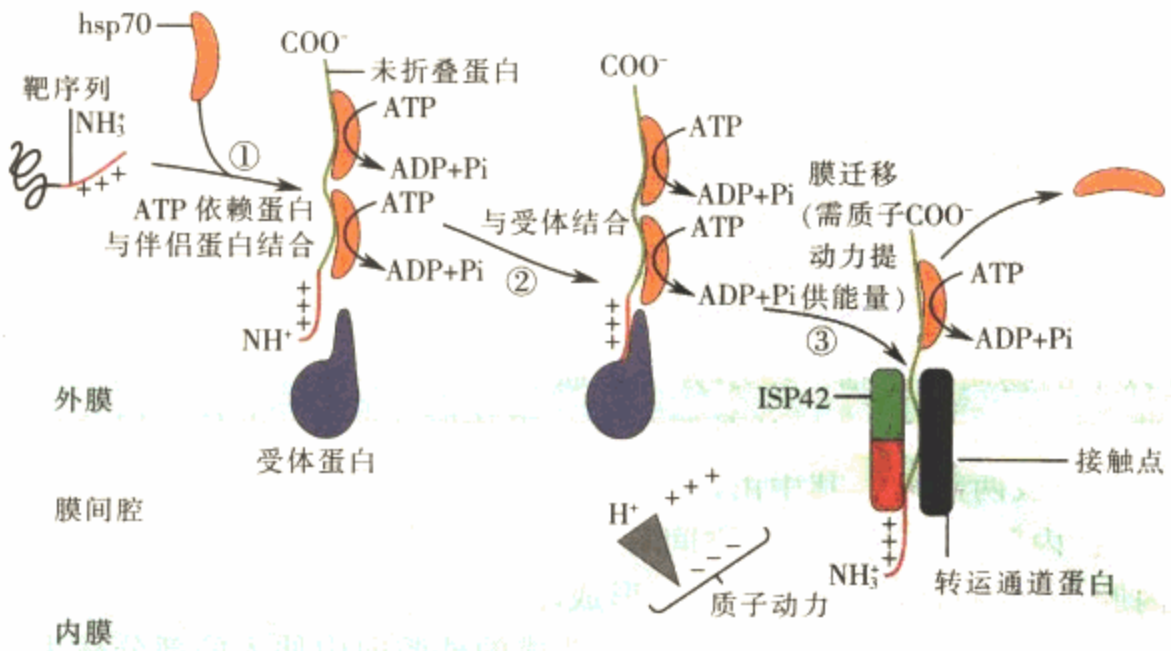
●图 6-1　线粒体由双层膜套叠而成

于其他膜成分。内膜通透性很小，分子量大于 150 的物质便不能通过。但内膜有高度的选择通透性，膜上的转运蛋白控制内外腔的物质交换，以保证活性物质的代谢。

内膜（包括嵴）的内表面附着许多突出于内腔的颗粒，每个线粒体大约有 10^4~10^5 个，称为基粒（elementary particle）。基粒分为头部、柄部、基片三部分，由多种蛋白质亚基组成。圆球形的头部突入内腔中，基片嵌于内膜中，柄部将头部与基片相连。基粒头部具有酶活性，能催化 ADP 磷酸化生成 ATP，因此，基粒又称 ATP 合酶复合体（ATP synthase complex）。

3. 内外膜转位接触点　利用电镜技术可以观察到在线粒体的内、外膜上存在着一些内膜与外膜相互接触的地方，在这些地方，膜间隙变狭窄，称为转位接触点（translocation contact site）（图 6-2），其间分布有蛋白质等物质进出线粒体的通道蛋白和特异性受体，分别称为内膜转位子（translocon of the inner membrane，Tim）和外膜转位子（translocon of the outer membrane，Tom）。有研究估计鼠肝细胞中直径 1μm 的线粒体有 100 个左右的转位接触点，用免疫电镜的方法可观察到转位接触点处有蛋白质前体的积聚，显示它是蛋白质等物质进出线粒体的通道。

4. 基质　线粒体内腔充满了电子密度较低的可溶性蛋白质和脂肪等成分，称之为基质（matrix）。线粒体中催化三羧酸循环、脂肪酸氧化、氨基酸分解、蛋白质合成等有关的酶都在基质中。此外还含有线粒体独特的双链环状 DNA、核糖体，这些构成了线粒体相对独立的遗传信息复制、转录和翻译系统。因此，线粒体是人体细胞除细胞核以外惟一含有



●图 6-2　内膜和外膜形成转位接触点

DNA 的细胞器，每个线粒体中可有一个或多个 DNA 拷贝，形成线粒体自身的基因组及其遗传体系。

5. 基粒　线粒体内膜（包括嵴）的内表面上突起的圆球形颗粒称为基粒，其化学本质是 ATP 合酶复合体（详见本章第三节）。

二、线粒体的化学组成

线粒体干重的主要成分是蛋白质，约占 65%~70%，多数分布于内膜和基质。线粒体蛋白质分为两类：一类是可溶性蛋白，包括基质中的酶和膜外周蛋白；另一类是不溶性蛋白，为膜结构蛋白或膜镶嵌酶蛋白。脂类占线粒体干重的 25%~30%，大部分是磷脂。此外，线粒体还含有 DNA 和完整的遗传系统，多种辅酶（如 CoQ、FMN、FAD 和 NAD^+等）、维生素和各类无机离子。

线粒体含有众多酶系，目前已确认有 120 余种，是细胞中含酶最多的细胞器。这些酶分别位于线粒体的不同部位，在线粒体行使细胞氧化功能时起重要作用。有些酶可作为线粒体不同部位的标志酶，如内、外膜的标志酶分别是细胞色素氧化酶和单胺氧化酶；基质和膜间腔的标志酶分别为苹果酸脱氢酶和腺苷酸激酶。

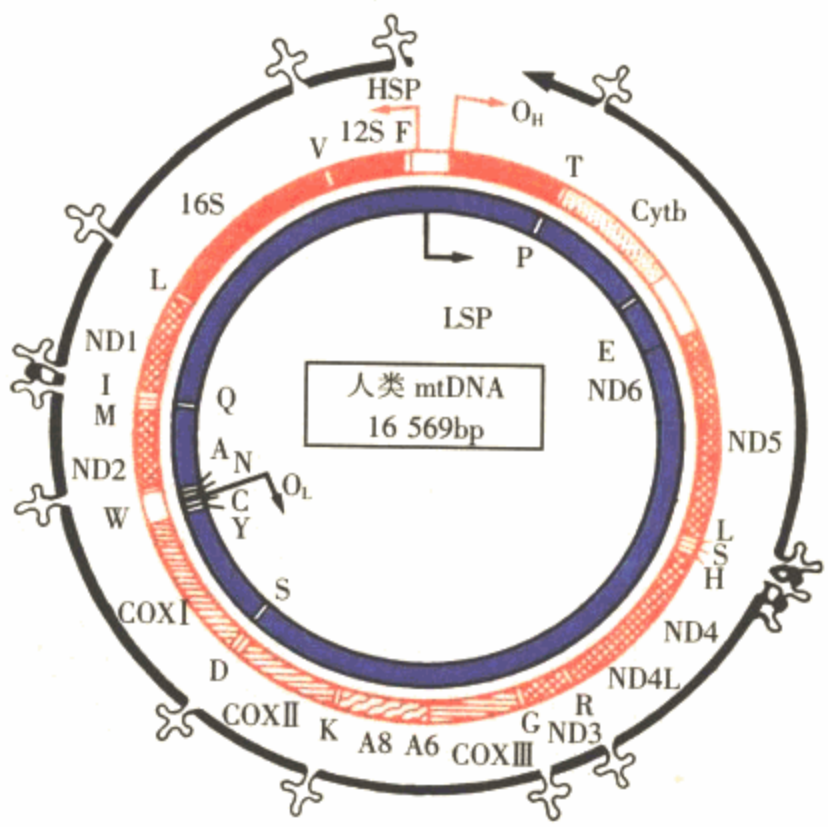
三、线粒体的遗传体系

线粒体虽然有自己的遗传系统和自己的蛋白质翻译系统，且部分遗传密码也与核密码有不同的编码含义，但它与细胞核的遗传系统构成了一个整体。

（一）线粒体 DNA 构成了线粒体基因组

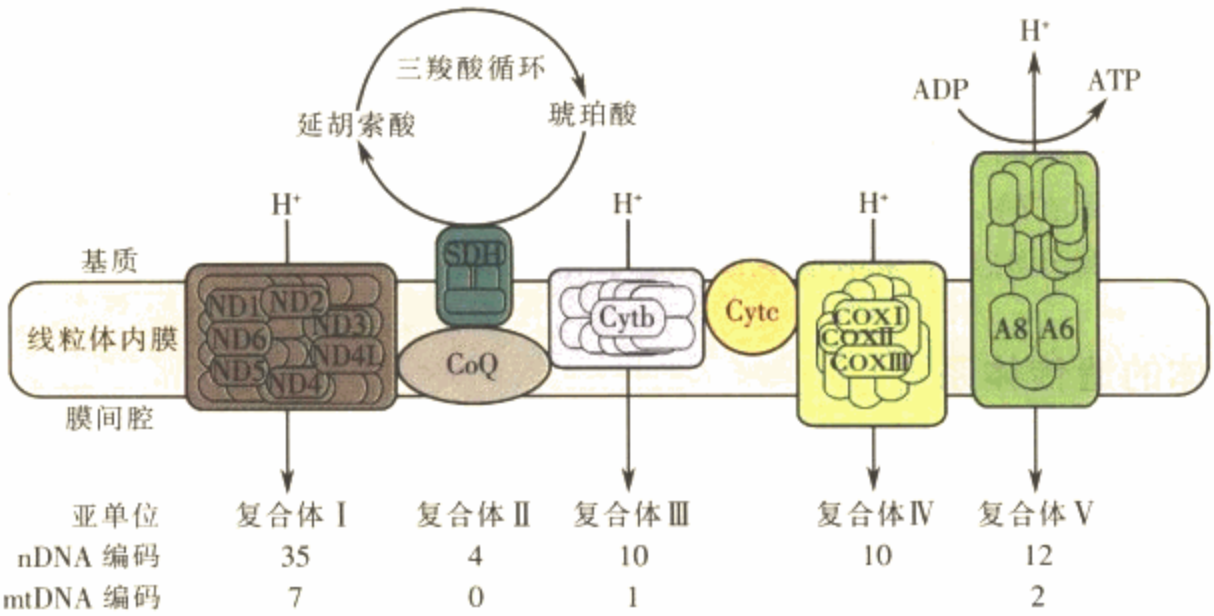
线粒体 DNA（mitochondrial DNA，mtDNA）通常是裸露的，不与组蛋白结合，存在于线粒体的基质内或依附于线粒体内膜。在一个线粒体内往往有 1 至数个 mtDNA 分子，平均为 5~10 个。主要编码线粒体的 tRNA、rRNA 及一些线粒体蛋白质，如电子传递链酶复合体中的亚基。但由于线粒体中大多数酶或蛋白质仍由细胞核 DNA 编码，所以它们在细胞质中合成后经特定的方式转送到线粒体中。

每一条线粒体 DNA 分子构成了线粒体基因组，其全序列的测定早已完成，线粒体基因组的序列（又称剑桥序列）共含 16 569 个碱基对（bp），为一条双链环状的 DNA 分子。双链中一为重链（H），一为轻链（L），这是根据它们的转录本在 CsCl 中密度的不同而区分的。重链和轻链上的编码物各不相同（图 6-3），人类线粒体基因组共编码了 37 个基因。重链上编码了 12S rRNA（小 rRNA）、16S rRNA（大 rRNA）、NADH-CoQ 氧化还原酶 1（NADH-CoQ oxidoreductase 1，ND1）、ND2、ND3、ND4L、ND4、ND5、细胞色素 C 氧化酶 1（cytochrome C oxidase Ⅰ，COX Ⅰ）、COX Ⅱ、COX Ⅲ、细胞色素 b 的亚基、ATP 合酶的第 6 亚单位和第 8 亚单位（A6、A8）及 14 个 tRNA 等（图中的大写字母表示其对应的氨基酸）；轻链编码了ND6 及 8 个 tRNA。



●图 6-3　人线粒体环状 DNA 分子及其转录产物

在这 37 个基因中，仅 13 个是编码蛋白质的基因，13 个序列都以 ATG（甲硫氨酸）为起始密码，并有终止密码结构，长度均超过可编码 50 个氨基酸多肽所必需的长度。由这 13 个基因所编码的蛋白质均已确定，其中 3 个为构成细胞色素 C 氧化酶（COX）复合体（复合体Ⅳ）催化活性中心的亚单位（COX Ⅰ、COX Ⅱ和 COX Ⅲ），这三个亚基与细菌细胞色素 C 氧化酶是相似的，其序列在进化过程中是高度保守的；还有 2 个为 ATP 合酶复合体（复合体Ⅴ）F_0 部分的 2 个亚基（A6 和 A8）；7 个为 NADH-CoQ 还原酶复合体（复合体Ⅰ）的亚基（ND1、ND2、ND3、ND4L、ND4、ND5 和 ND6）；还有 1 个编码的结构蛋白质为 $CoQH_2$-细胞色素 C 还原酶复合体（复合体Ⅲ）中细胞色素 b 的亚基（图 6-4）；其他 24 个基因编码两种 rRNA 分子（用于构成线粒体的核糖体）和 22 种 tRNA 分子（用于线粒体 mRNA 的翻译）。



● 图 6-4　呼吸链蛋白质的组成

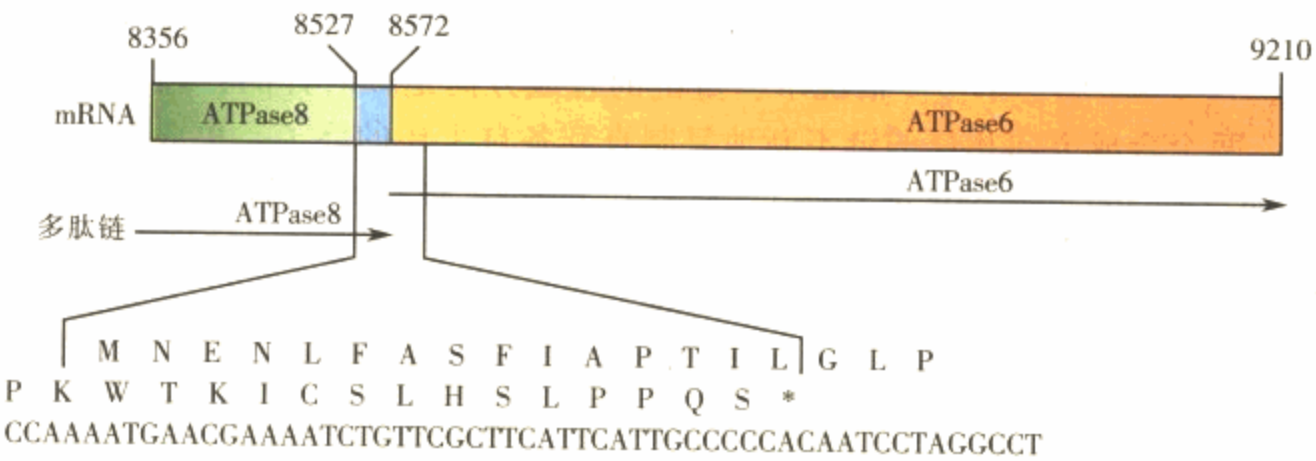
线粒体基因组与核基因组相比，经济或紧凑了许多，核基因组中的非编码序列高达 90%，而在线粒体基因组中只有很少非编码的序列。

（二）重链和轻链各有一个启动子启动线粒体基因的转录

线粒体基因组的转录是从两个主要的启动子处开始的，分别为重链启动子（heavy-strand promoter，HSP）和轻链启动子（light-strand promoter，LSP）。线粒体转录因子 1（mitochondrial transcription factor 1，mtTFA）参与了线粒体基因的转录调节。mtTFA 可与 HSP 和 LSP 上游的 DNA 特定序列相结合，并在 mtRNA 聚合酶的作用下启动转录过程。线粒体基因的转录类似原核生物的转录，即产生一个多顺反子（polycistronic transcription），其中包括多个 mRNA 和散布于其中的 tRNA，剪切位置往往发生在 tRNA 处，从而使不同的 mRNA 和 tRNA 被分离和释放。重链上的转录起始位点有两个，形成两个初级转录物。初级转录物Ⅰ开始于 $tRNA^{phe}$，终止于 16S rRNA 基因的末端，最终被剪切为 $tRNA^{phe}$、$tRNA^{val}$、12S rRNA 和 16S rRNA。初级转录物Ⅱ的起始位点比初级转录Ⅰ的起始位点要稍微靠下一点，大约在 12S rRNA 基因的 5′端，它的转录通过初级转录物Ⅰ的终止位置持续转录至几乎整个重链。转录物Ⅱ经剪切后释放出 tRNA 和共 13 个多聚腺嘌呤的 mRNA，但没有任何 rRNA。通常情况下，剪切在新生的转录链上就开始了。剪切的 mRNA 与 tRNA 位置是非常精确的，因为每个 mRNA 的 5′端与 tRNA 的 3′端是紧密相连的。转录物Ⅰ的转录比转录物Ⅱ的转录要频繁得多，前者约是后者的 10 倍，这样 rRNA 和 2 个 tRNA 将比其他 mRNA 和 tRNA 要合成得多。轻链转录物经剪切形成 8 个 tRNA 和 1 个mRNA，其余几乎不含有用信息的部分被很快降解。

与核合成 mRNA 不同，线粒体 mRNA 不含内含子，也很少有非翻译区。每个 mRNA 5′端起始密码的三个碱基为 AUG（或 AUA），UAA 终止密码位于 mRNA 的 3′端。某些情况下，一个碱基 U 就是 mtDNA 体系中的终止密码子，而后面的两个 A 是多聚腺嘌呤尾巴的一部分，这两个 A 往往是在 mRNA 前体合成好之后才加上去的。加工后的 mRNA 的 3′端往往有约 55 个核苷酸多聚 A 的尾部，但是没有细胞核 mRNA 加工时的帽结构。

所有 mtDNA 编码的蛋白质也是在线粒体内并在线粒体的核糖体上进行翻译的。线粒体编码的 RNA 和蛋白质并不运出线粒体外，相反，构成线粒体核糖体的蛋白质则是由细胞质运入线粒体内的。用于蛋白质合成的所有 tRNA 都是由 mtDNA 编码的。值得一提的是线粒体基因中两个重叠基因，一个是复合物 I 的 ND4L 和 ND4，另一个是复合物 V 的 ATP 酶 8 和 ATP 酶 6（图 6-5）。



●图 6-5　ATPase8 和 ATPase6 亚基翻译重叠框架

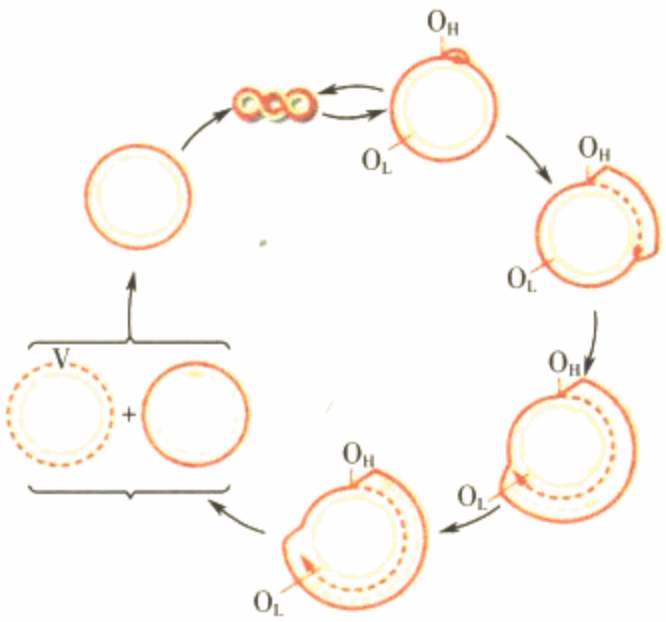
线粒体 mRNA 翻译的起始氨基酸为甲酰甲硫氨酸，这点与原核生物类似。另外线粒体的遗传密码也与核基因不完全相同（表 6-1），例如 UGA 在核编码系统中为终止密码，但在人类细胞的线粒体编码系统中，它编码色氨酸。

表 6-1　线粒体与核密码子编码氨基酸比较

密码子	核密码子编码氨基酸	线粒体密码子编码氨基酸				
		哺乳动物	果蝇	链孢酶菌	酵母	植物
UGA	终止密码子	色氨酸	色氨酸	色氨酸	色氨酸	终止密码子
AGA、AGG	精氨酸	终止密码子	丝氨酸	精氨酸	精氨酸	精氨酸
AUA	异亮氨酸	甲硫氨酸	甲硫氨酸	异亮氨酸	异亮氨酸	异亮氨酸
AUU	异亮氨酸	异亮氨酸	甲硫氨酸	甲硫氨酸	甲硫氨酸	异亮氨酸
CUU、CUC CUA、CUG	亮氨酸	亮氨酸	亮氨酸	苏氨酸	亮氨酸	亮氨酸

（三）线粒体 DNA 的两条链有各自的复制起始点

环形的人类线粒体 DNA 的复制类似于原核细胞的 DNA 复制，但也有自己的特点。典型的细菌（如 *E.coli*）环形基因组有一个复制起始点（origin），并从某一位点进行双向复制，因此子链 DNA 的合成既需要 DNA 聚合酶（以母链为模板在 RNA 引物上合成子链 DNA），也需要 RNA 聚合酶（催化合成短的 RNA 引物），并以相反的方向同时进行。人类 mtDNA 也是单一的复制起始，mtDNA 的复制起始点被分成两半，一个是在重链上，称为重链复制起始点（origin of heavy-strand replication，O_H），位于环的顶部，$tRNA^{Phe}$ 基因（557）和 $tRNA^{Pro}$ 基因（16023）之间的控制区（control region），它控制重链子链 DNA 的自我复制；另一个是在轻链上，称为轻链复制起始点（origin of light-strand replication，



●图 6-6　线粒体 DNA 的复制

O_L），位于环的“8”点钟位置，它控制轻链子链 DNA 的自我复制。这种两个复制点的分开导致 mtDNA 的复制机制比较特别，需要一系列进入线粒体的核编码蛋白的协助（图 6-6）。

与细菌 DNA 一样，mtDNA 的复制也需要 RNA 引物作为 DNA 合成的起始，线粒体的 RNA 聚合酶从位于 O_H 和 $tRNA^{Phe}$ 基因之间的 3 个上游保守序列区段（conserved sequence blocks，CSB Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ）之一附近开始合成一段分子量相对较大的 RNA 引物，后者与相应的轻链互补结合，并暂时替代（displacement）控制区的重链，所形成的环状结构称 D 环（displacement loop）；轻链的复制要晚于重链，等重链合成一定的长度后，轻链才开始合成。一般情况下，重链的合成方向是顺时针的；轻链的合成方向是逆时针的。两个合成方向相反的链不断地复制直到各自半环的终了，单股的母环形成一个连锁的对环（a catenated pair of rings），后者在 mtDNA 拓扑异构酶的作用下去连锁，释放出新合成的子链，整个复制过程约持续 2 个小时，比一般的复制时间要长（线粒体：16 569bp/2 小时；大肠杆菌 400 万 bp/40 分钟）（图 6-6）。此外，mtDNA 的复制特点还包括它的复制不受细胞周期的影响，可以越过细胞周期的静止期或间期，甚至可分布在整个细胞周期。

四、核编码蛋白质向线粒体的转运

线粒体中有大约有 1 000 个基因产物，其中仅 37 个基因产物由线粒体基因组编码，因此线粒体内大多数参与电子传递链的蛋白都是核编码的线粒体蛋白。

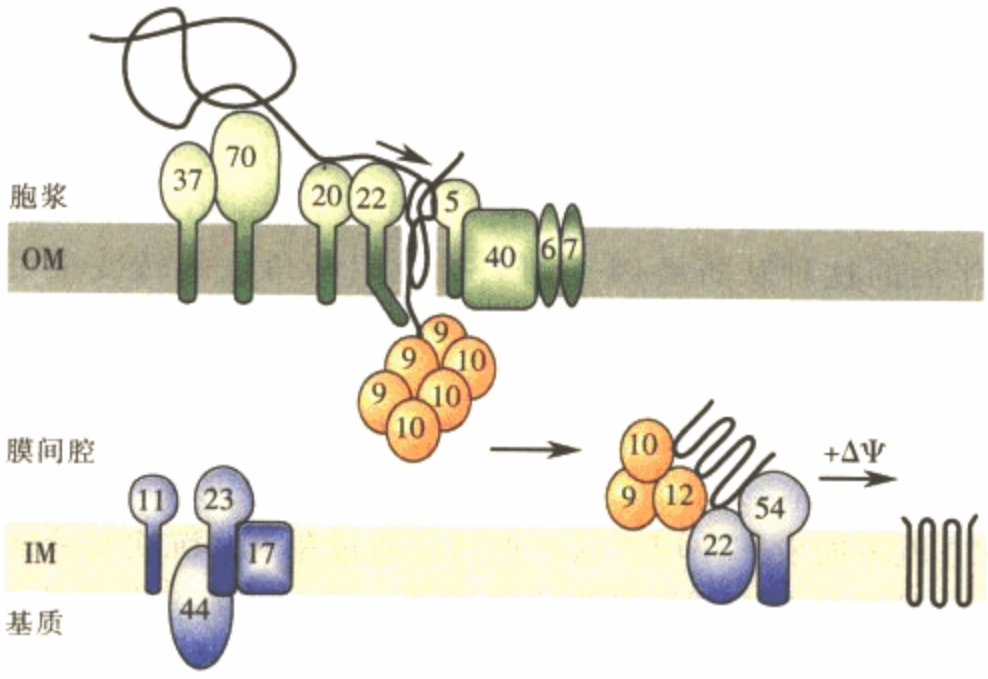
（一）核编码蛋白向线粒体基质中的转运

1. 核编码蛋白进入线粒体时需要分子伴侣蛋白的协助　由细胞核编码的线粒体蛋白在胞浆中合成后进入线粒体。在进入线粒体的过程中，靠分子伴侣的协助，绝大多数线粒体蛋白被输入到基质，少数输入到膜间腔以及插入到内膜和外膜上。输入到线粒体的蛋白质都在其 N-端具有一段基质导入序列（matrix-targeting sequence，MTS），线粒体外膜和内膜上的受体能识别并结合各种不同的但相关的 MTS，在这些序列中，富含有精氨酸、赖氨酸、丝氨酸和苏氨酸，但少见天冬氨酸和谷氨酸。这些序列包含了所有介导在细胞质中合成的前体蛋白输入到线粒体基质的信号。

2. 前体蛋白在线粒体外保持非折叠状态　当线粒体蛋白可溶性前体（soluble precursor of mitochondrial proteins）在核糖体内形成以后，少数前体蛋白与一种称为新生多肽相关复合物（nascent-associated complex，NAC）的分子伴侣蛋白相互作用，NAC 的确切作用尚不清楚，但明显增加了蛋白转运的准确性；而绝大多数的前体蛋白都要和一种称为热休克蛋白 70（constitutive heat shock protein70，hsc70）的分子伴侣结合，从而防止前体蛋白形成不可解开的构象，也可以防止已松弛的前体蛋白聚集（aggregation）。此外，在哺乳动物的胞浆中还存在着两种能够准确结合线粒体前体蛋白的因子：前体蛋白的结合因子（presequence-binding factor，PBF）和线粒体输入刺激因子（mitochondrial import stimulatory factor，MSF），前者能够增加 hsc70 对线粒体蛋白的转运；后者不依赖于 hsc70，常单独发挥着 ATP 酶的作用，为聚集蛋白的解聚提供能量。

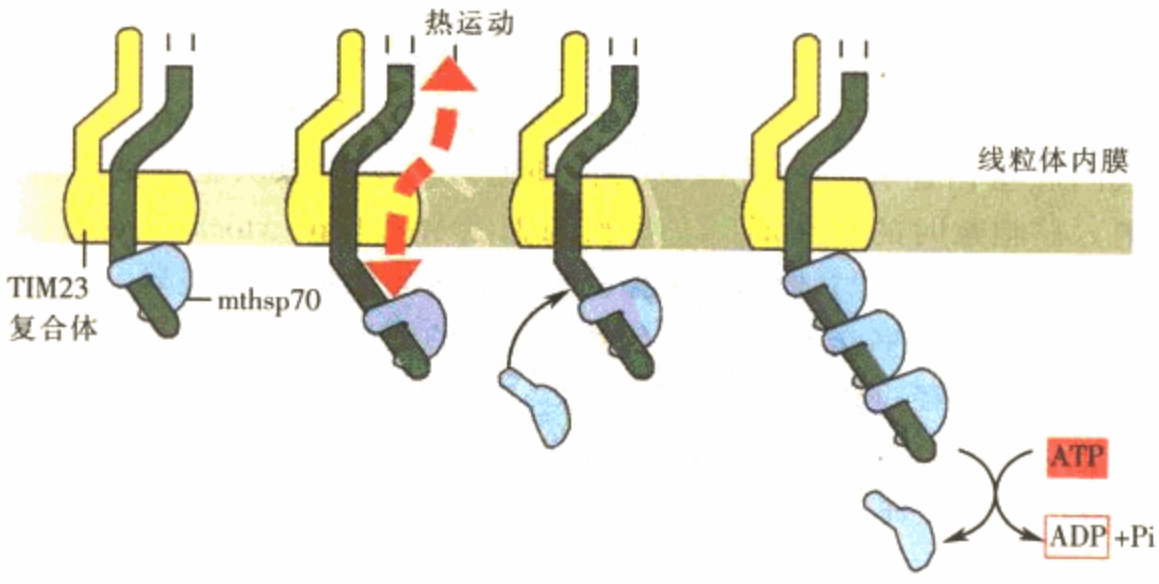
某些前体蛋白如内膜 ATP/ADP 反向转运体与 MSF 所形成的复合体能进一步与外膜上

的一套受体 Tom37 和 Tom70 相结合，然后 Tom37 和 Tom70 把前体蛋白转移到第二套受体 Tom20 和 Tom22，同时释放 MSF；而绝大多数与 hsc70 结合的前体蛋白常不经过受体 Tom37 和 Tom70，而直接与受体 Tom20 和 Tom22 结合，与前体蛋白结合的受体 Tom20 和 Tom22 与外膜上的通道蛋白 Tom40（第三套受体）相耦联，后者与内膜的接触点共同组成一个直径为 1.5~2.5nm 的越膜通道（tim17 受体系统）（图 6-7），非折叠的前体蛋白通过这一通道转移到线粒体基质。



●图 6-7　tom 和 tim 受体系统

3. 分子运动产生的动力协助多肽链穿越线粒体膜　前体蛋白一旦和受体结合后，就要和外膜及内膜上膜通道发生作用才可进入线粒体。在此过程中，一种也为分子伴侣的线粒体基质 hsc70（mthsp70）可与进入线粒体腔的前导肽链交联，提示 mthsp70 参与了蛋白质的转运。S. M. Simon 等提出一种作用机制，即布朗棘轮模型（Brownian Rachet model）（图 6-8），该模型认为在蛋白质转运孔道内，多肽链做布朗运动摇摆不定，一旦前导肽链自发进入线粒体腔，立即有一分子 mthsp70 结合上去，这样就防止了前导肽链退回细胞质；随着肽链进一步伸入线粒体腔，肽链会结合更多的 mthsp70 分子。根据该模型可以预测一条折叠肽链的转运应不慢于其自发解链，许多蛋白质的自发解链极慢，如细胞色素 b_2，其解链速度以小时计；而细胞色素 b_2 可在几分钟内进入线粒体。对这种快速转运的发生最直接的解释是 mthsp70 可拖拽前导肽链，而要拖拽肽链，mthsp70 必须同时附着在肽



●图 6-8　布朗棘轮模型示意图

链和线粒体膜上，这一排列方式使 mthsp70 通过变构可产生拖力：首先 mthsp70 以一种高能构象结合前导肽链，然后松弛为一种低能构象，促使前导肽链进入，并迫使后面的肽链解链以进入转运轨道。这种假说将 mthsp70 描绘成“转运发动机”，类似于肌球蛋白和肌动蛋白的牵拉作用。

4. 多肽链需要在线粒体基质内重新折叠才形成有活性的蛋白质　蛋白质跨膜转运至线粒体基质后，必须恢复其天然构象以行使功能。当蛋白跨过线粒体膜后，大多数蛋白的基质导入序列被基质作用蛋白酶（matrix processing protease，MPP）所移除。人们还不知道确切的蛋白水解时间，但这种水解反应很可能是一种早期事件，因为此类 MPP 定位于线粒体内膜上。和转运过程不同，此时的蛋白质需要进行重新折叠，而在周围的蛋白质浓度约为 500~600mg/ml 的环境下，蛋白质要自发的重新折叠简直不可能。此时，mthsp70 又发挥了其重要的作用，但这时 mthsp70 是作为折叠因子而不是去折叠因子，分子伴侣的这种从折叠因子到去折叠因子角色的转变很可能有线粒体 Dna J 家族的参与，实验显示去除 Dna J1P 不会影响前体蛋白进入线粒体，但可以明显阻止其折叠。

在大多数情况下，输入多肽的最后折叠还需要另外一套基质分子伴侣如 hsc60、hsc10 的协助；hsc60 的突变体并不影响前体蛋白进入线粒体，但进入的前体蛋白不能形成低聚复合物，因而 hsc70 就不能发挥作用，这一点已经通过免疫共沉淀实验证实。

经过上述过程，线粒体蛋白质顺利进入线粒体基质，并成熟形成其天然构象。

（二）核编码蛋白向线粒体其他部位的转运

核编码的（线粒体）蛋白除了向线粒体的基质转运外，还包括向线粒体的膜间腔、内膜和外膜的转运，这类蛋白除了都具有 MTS 外，一般还都具有第 2 类信号序列，它们通过与进入线粒体基质类似的机制进入线粒体其他部位。

1. 蛋白质向线粒体膜间腔的转运　膜间腔蛋白质如细胞色素 c_1 和细胞色素 b_2（Co-QH_2-细胞色素 c 还原酶复合体亚单位）的前体蛋白就分别携带有功能上相似，但氨基酸序列不完全相同的信号序列，称为膜间腔导入序列（intermembrane space-targeting sequence，ISTS），后者引导前体蛋白进入膜间腔。绝大多数情况下，这类蛋白的 N-端首先进入基质，并在蛋白酶的作用下切去它的 MTS 部分，接下去依照 ISTS 的不同，有 2 种转运方式：一种方式是整个蛋白（如细胞色素 c_1）进入基质，并与基质中的 mthsp70 结合，随后其分子上的第 2 个信号序列 ISTS 引导多肽链通过内膜上的通道进入膜间腔；另一种方式是前体蛋白（如细胞色素 b_2）的第 2 个信号序列 ISTS 起转移终止序列（stop-transfer sequence）的作用，进而阻止前体蛋白的 C 端进一步通过内膜上的通道向基质转运，并固定于内膜上，随后固定于内膜上的蛋白前体发生侧向运动而扩散，最后前体蛋白在膜间腔蛋白酶的作用下，切去位于内膜上的 ISTS 部分，C 端则脱落于膜间腔。

此外，膜间腔蛋白还有一种转运方式，即通过直接扩散从胞浆通过外膜而进入膜间腔。细胞色素 c 在胞浆时的存在形式称为辅细胞色素 c（apocytochrome c），它在膜间腔中与血红素结合后的全酶形式与辅细胞色素 c 没有氨基酸组成上的差异，说明它的转运没有涉及到前体蛋白的剪切。事实上在外膜上存在特定的通道（如类孔蛋白 P70），细胞色素 c 就是通过这样的通道途径进入膜间腔的。

2. 蛋白质向线粒体外膜和内膜的转运　在外膜蛋白的转运中，类孔蛋白（porin-like）P70 的研究最多。事实上在 P70 的 MTS 后有一段长的疏水序列，也起着转移终止序列的作用，而使之固定于外膜上；而内膜上的蛋白质的转运机制尚不完全清楚。

五、线粒体的起源与发生

（一）线粒体是通过分裂方式实现增殖的

对于现代真核细胞中的线粒体发生机制，学术界也一直存有争论。目前有三种关于线粒体生物发生的观点，即重新合成，起源于非线粒体的亚细胞结构，以及通过原有线粒体的分裂形成。自从线粒体 DNA 发现后，生物学家较普遍地接受这样的观点：线粒体是以分裂的方式进行增殖的。G. Attardi 等（1975）认为，线粒体的生物发生过程分两个阶段。在第一阶段，线粒体进行分裂增殖；第二阶段包括线粒体本身的分化过程，建成能够行使氧化磷酸化功能的机构。线粒体的分裂增殖和分化阶段分别接受细胞核和线粒体两个独立的遗传系统控制。

但是，关于线粒体如何进行分裂增殖的，目前尚未完全明了。一般认为它可能包括以下三种分裂方式：①出芽分裂：线粒体分裂时先从线粒体上长出膜性突起，称为“小芽”(budding)，随后小芽不断长大，并与原线粒体分离，再经过不断“发育”，最后形成新的线粒体；②收缩分裂：这种分裂方式是线粒体在其中央处收缩形成很细的“颈”，最后断裂，形成两个线粒体；③间壁分裂：这种分裂方式是线粒体的内膜向中心内褶形成分隔线粒体结构的间壁，随后再一分为二，形成两个线粒体。

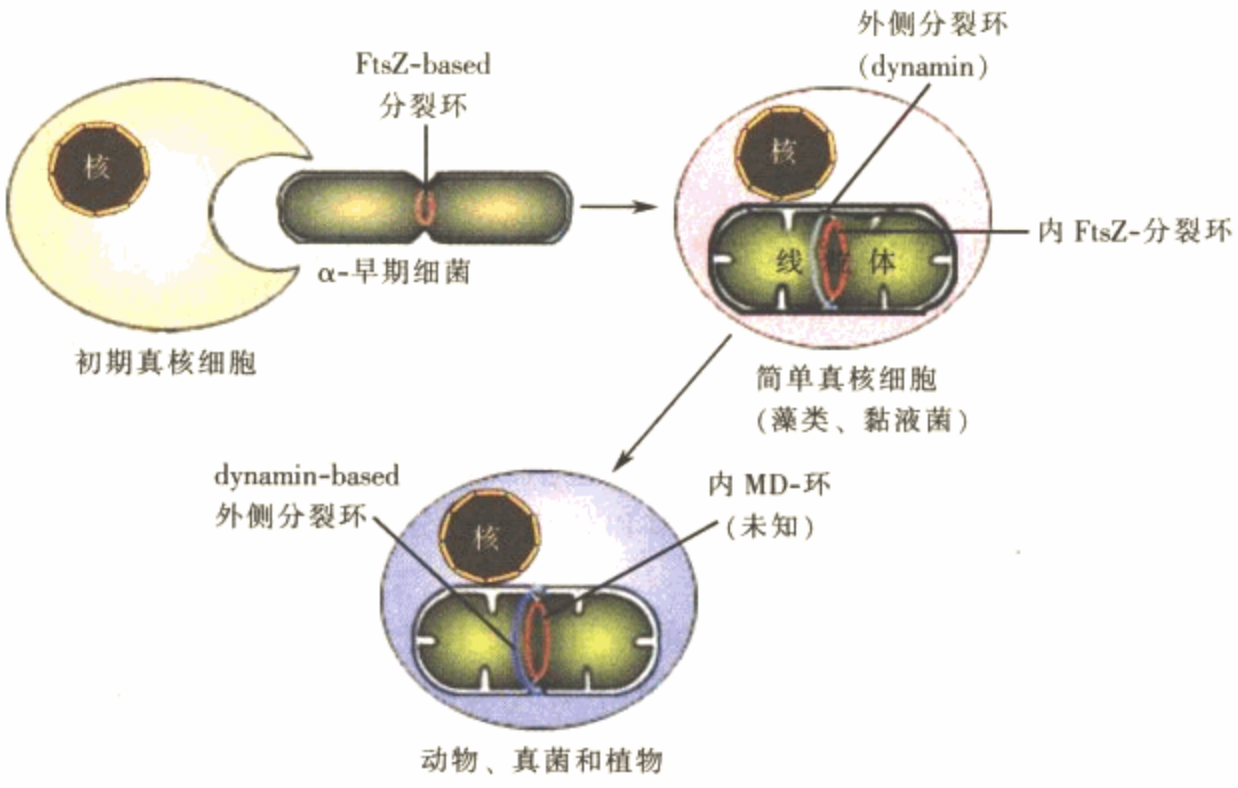
无论是哪一种分裂机制，线粒体的分裂都不是绝对均等的。例如经过复制的 mtDNA 在分裂后的线粒体中的分布就是不均等的。另一方面线粒体分裂还受到细胞分裂的影响。

（二）mtDNA 随机地、不均等地被分配到新的线粒体中

在同一线粒体中，可能存在有不同类型的 mtDNA，即野生型和突变型 mtDNA。分裂时，野生型和突变型 mtDNA 发生分离，随机地分配到新的线粒体中；同时，同一细胞中，也可能存在着带有不同 mtDNA 的线粒体，如野生型和突变型线粒体。分裂时，野生型和突变型 mtDNA（或线粒体）发生分离，随机地分配到新的线粒体（或细胞）中；使子线粒体（或子细胞）拥有不同比例的突变型 mtDNA 分子，这种随机分配导致 mtDNA 异质性变化的过程称为复制分离。在连续的分裂过程中，异质性细胞中突变型 mtDNA 和野生型 mtDNA 的比例会发生漂变，向同质性的方向发展。分裂旺盛的细胞（如血细胞）往往有排斥突变 mtDNA 的趋势，经无数次分裂后，细胞逐渐成为只有野生型 mtDNA 的同质性细胞。突变 mtDNA 具有复制优势，在分裂不旺盛的细胞（如肌细胞）中逐渐积累，形成只有突变型 mtDNA 的同质性细胞。漂变的结果，表型也随之发生改变。

（三）线粒体可能起源于共生的早期细菌

线粒体可能起源于与古老厌氧真核细胞共生的早期细菌。在之后的长期进化过程中，二者共生联系更加密切，共生物的大部分遗传信息转移到细胞核上，这样留在线粒体上的遗传信息大大减少，即线粒体起源的内共生学说（图 6-9）。许多证据支持这一假说，线粒体的遗传系统与细菌相似，如 DNA 呈环状、不与组蛋白结合；线粒体的蛋白质合成方式与细菌相似，如核糖体为 70S，抑制蛋白质合成的机制等。但这一机制也有不足之处，所以有学者提出了非共生假说。非共生假说认为原始的真核细胞是一种进化程度较高的需氧细菌，参与能量代谢的电子传递系统、氧化磷酸化系统位于细胞膜上。随着不断进化，细胞需要增加其呼吸功能，因此不断地增加其细胞膜的表面积，增加的膜不断地内陷、折叠、融合，并被其他膜结构包裹（形成的双层膜将部分基因组包围在其中），形成功能上特殊（有呼吸功能）的双层膜性囊泡，最后演变为线粒体。



●图 6-9　线粒体起源的内共生学说

第二节　细胞呼吸与能量转换

一、细胞呼吸

较高等的动物都能依靠呼吸系统从外界吸取 O_2 并排出 CO_2。从某种意义上说细胞中也存在有这样的呼吸作用，即在细胞内特定的细胞器（主要是线粒体）内，在 O_2 的参与下，分解各种大分子物质，产生 CO_2；与此同时，分解代谢所释放出的能量储存于 ATP 中，这一过程称为细胞呼吸（cellular respiration），也称为生物氧化（biological oxidation）或细胞氧化（cellular oxidation）。细胞呼吸是细胞内提供生物能源的主要途径，它的化学本质与燃烧反应相同，最终产物都是 CO_2 和 H_2O，释放的能量也完全相等。但是，细胞呼吸具有以下特点：① 细胞呼吸本质上是在线粒体中进行的一系列由酶系所催化的氧化还原反应；② 所产生的能量储存于 ATP 的高能磷酸键中；③ 整个反应过程是分步进行的，能量也是逐步释放的；④ 反应是在恒温（37℃）和恒压条件下进行的；⑤ 反应过程中需要 H_2O 的参与。

二、细胞能量的转换分子——ATP

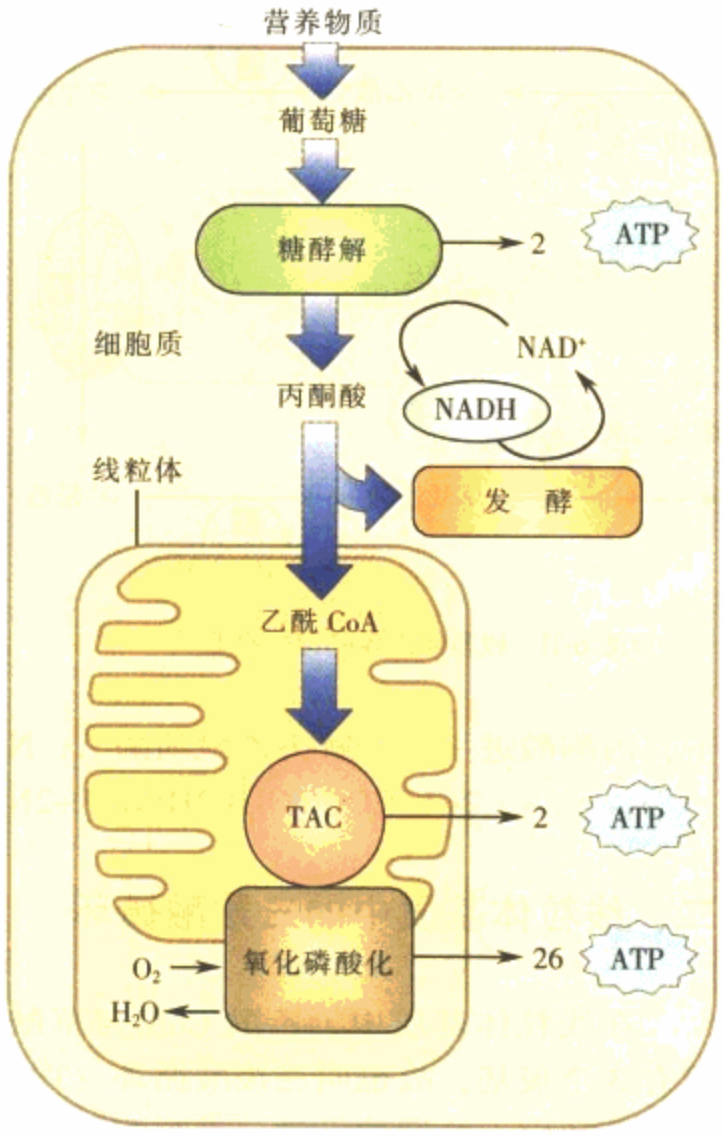
前面已提到，细胞呼吸所产生的能量并不像燃烧所产生的热能那样散发出来，而是储存于细胞能量转换分子 ATP 中。ATP 是一种高能磷酸化合物，细胞呼吸时，释放的能量可通过 ADP 的磷酸化而及时储存于 ATP 的高能磷酸键中作为备用；反之，当细胞进行各种活动需要能量时，又可去磷酸化，断裂一个高能磷酸键以释放能量来满足机体需要。ATP 的放能、储能反应简式如下：

$$\text{A-P\~{}P\~{}P} \underset{\text{磷酸化}}{\overset{\text{去磷酸化}}{\rightleftharpoons}} \text{A-P\~{}P+Pi+能量}$$

随着细胞内不断进行的能量释放和储存，ATP 与 ADP 不停地进行着互变。因为 ATP 是细胞内能量转换的中间携带者，所以被形象地称为“能量货币”。ATP 是细胞生命活动的直接供能者，也是细胞内能量获得、转换、储存和利用等环节的联系纽带。

第三节　细胞的能量转换

ATP 中所携带的能量来源于糖、氨基酸和脂肪酸等的氧化，这些物质的氧化是能量转换的前提。以葡萄糖氧化为例，从糖酵解到 ATP 的形成是一个极其复杂的过程，大体分为三个步骤：即糖酵解（glycolysis）、三羧酸循环（tricarboxylic acid cycle，TAC）和氧化磷酸化（oxidative phosphorylation）（图 6-10）。蛋白质和脂肪的彻底氧化只在第一步中与糖有所区别。



●图 6-10　葡萄糖氧化的三个步骤

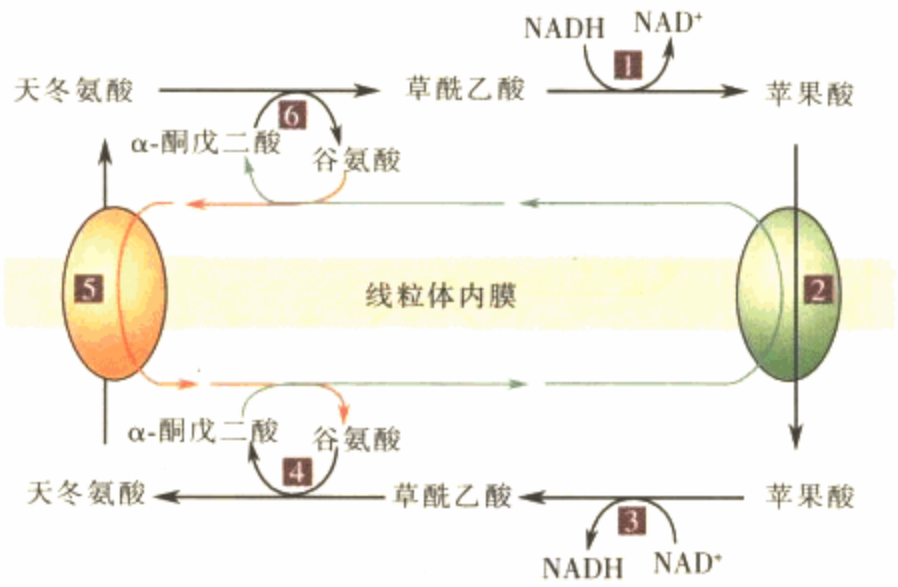
一、葡萄糖在细胞质中的糖酵解

糖酵解在细胞质中进行，其过程可概括为以下方程式：

$$C_6H_{12}O_6+2NAD^++2ADP+2Pi \xrightarrow{\text{糖酵解酶系}} \begin{cases} \xrightarrow{\text{进入有氧氧化}} 2CH_3COCOOH+2NADH+2H^++2ATP \\ \xrightarrow{\text{完成无氧氧化}} \begin{cases} 2CH_3CHOHCOOH+2NAD^++2ATP \\ 2CH_3CH_2OH+2CO_2+2NAD^++2ATP \end{cases} \end{cases}$$

1 分子葡萄糖经过十多步反应，生成 2 分子丙酮酸，同时脱下 2 对 H 交给受氢体 NAD^+携带，形成 2 分子 $NADH+H^+$。NAD^+能可逆地接受 2 个电子和 1 个 H^+，另 1 个 H^+则留在溶质中。在糖酵解过程中一共生成 4 分子 ATP，但由于要消耗 2 分子 ATP，所以净生成 2 分子的 ATP。若从糖原开始糖酵解，因不需消耗 1 分子 ATP 使葡萄糖磷酸化，则总反应净生成 3 分子 ATP。这种由高能底物水解放能，直接将高能磷酸键从底物转移到 ADP 上，使 ADP 磷酸化生成 ATP 的作用，称为底物水平磷酸化（substrate-level phosphorylation）。

糖酵解产物丙酮酸的代谢去路，因不同生活状态的生物而异。专性厌氧生物在无氧情况下，丙酮酸可由 $NADH+H^+$ 供氢而还原为乳酸或乙醇，从而完成无氧氧化过程。专性需氧生物在供氧充足时，丙酮酸与 $NADH+H^+$ 将作为有氧氧化原料进入线粒体中。丙酮酸进入线粒体的机制尚不完全明了，可能以其自身的脂溶性通过线粒体内膜；$NADH+H^+$ 本身不能透过线粒体内膜，故 $NADH+H^+$ 进入线粒体的方式较为复杂，必须借助于线粒体内膜上特异性穿梭系统进入线粒体内。肝脏、肾脏和心肌线粒体转运 $NADH+H^+$ 的主要方式如图 6-11 所示，胞液中 $NADH+H^+$ 经苹果酸脱氢酶作用，使草酰乙酸接受 2 个 H 而成为苹果酸；苹果酸经内膜上苹果酸-α-酮戊二酸逆向运输载体的变



●图 6-11　线粒体内膜的穿梭机制

构作用转入线粒体内；进入线粒体的苹果酸在苹果酸脱氢酶作用下，以 NAD^+ 为受氢体形成草酰乙酸和 $NADH+H^+$；而草酰乙酸不能经内膜回到胞液，于是它与谷氨酸经谷-草转氨酶的作用而相互转变为天冬氨酸和α-酮戊二酸，这两者都能在逆向运输载体的帮助下透过内膜进入胞液中去；线粒体内消耗的谷氨酸则由胞液内的谷氨酸与外出的天冬氨酸通过谷氨酸–天冬氨酸逆向运输载体实现交换运输以取得补充。另外，在脑和昆虫的飞翔肌中还存在一种 α-磷酸甘油穿梭系统。

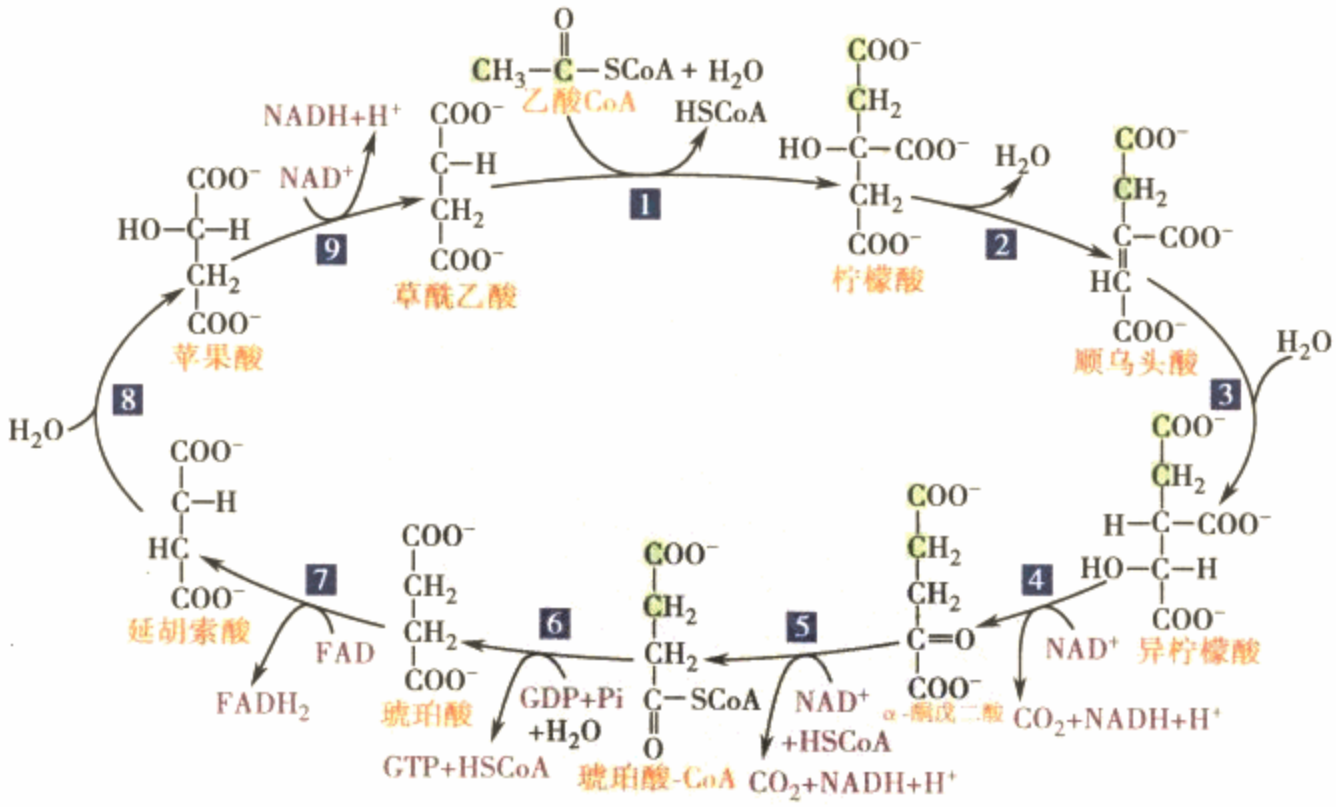
在线粒体基质中丙酮酸脱氢酶体系作用下，丙酮酸进一步分解为乙酰辅酶 A，NAD^+作为受氢体被还原：

$$2CH_3COCOOH+2HSCoA+2NAD^+ \longrightarrow 2CH_3CO\text{-}ScoA+2CO_2+2NADH+2H^+$$

二、线粒体基质中的三羧酸循环

在线粒体基质中，乙酰 CoA 与草酰乙酸结合成柠檬酸而进入柠檬酸循环，由于柠檬酸有 3 个羧基，故也叫三羧酸循环（TAC 循环）（图 6-12）。

循环中，柠檬酸经过一系列酶促的氧化脱氢和脱羧反应，其中的 2 个碳原子氧化形成 CO_2，从而削减了 2 个碳原子。在循环的末端，又重新生成草酰乙酸，而草酰乙酸又可和另 1 个乙酰 CoA 结合，生成柠檬酸，开始下一个循环，如此周而复始。整个过程中，总共消耗了 3 个 H_2O，生成 1 分子的 GTP（可转变为 1 分子的 ATP）、4 对 H 和 2 分子CO_2。脱下的 4 对 H，其中 3 对以 NAD^+为受氢体，另 1 对以 FAD 为受氢体。FAD 能可逆地接受 2 个 H，即 2 个质子和 2 个电子，转变成还原态 $FADH_2$。ATP/ADP 及 $NADH/NAD^+$ 比值高时均能降低三羧酸循环的速度。三羧酸循环总的反应式为：



●图 6-12　三羧酸循环

$$2CH_2COSCoA+6NAD^++2FAD+2GDP+2Pi+6H_2O\rightarrow$$
$$4CO_2+6NADH+6H^++2FADH_2+2HSCoA+2GTP$$

三羧酸循环是各种有机物进行最后氧化的过程，也是各类有机物相互转化的枢纽。除了丙酮酸外，脂肪酸和一些氨基酸也从细胞浆进入线粒体，并进一步转化成乙酰 CoA 或三羧酸循环的其他中间体。三羧酸循环的中间产物可用来合成包括氨基酸、卟啉及嘧啶核苷酸在内的许多物质。只有经过三羧酸循环，有机物才能进行完全氧化，提供远比糖无氧酵解所能提供的多得多的能量，供生命活动的需要。

三、线粒体氧化磷酸化耦联与 ATP 形成

氧化磷酸化是释放代谢能的主要环节，在这个过程中，NADH 和 $FADH_2$ 分子把它们从食物氧化得来的电子转移到氧分子。这一反应相当于氢原子在空气中燃烧最终形成水的过程，释放出的能量绝大部分用于生成 ATP，少部分以热的形式释放。

（一）呼吸链和 ATP 合酶复合体是氧化磷酸化的结构基础

1. 呼吸链　1 分子的葡萄糖经无氧氧化、丙酮酸脱氢和三羧酸循环，共产生了 6 分子的 CO_2 和 12 对 H，这些 H 必须进一步氧化成为水，整个有氧氧化过程才告结束。但 H 并不能与 O_2 直接结合，一般认为 H 须首先离解为 H^+和 e^-，电子经过线粒体内膜上酶体系的逐级传递，最终使 $1/2O_2$ 成为 O^{2-}，后者再与基质中的 2 个 H^+化合生成 H_2O。这一传递电子的酶体系是由一系列能够可逆地接受和释放 H^+和 e^-的化学物质所组成，它们在内膜上有序地排列成相互关联的链状，称为呼吸链（respiratory chain）或电子传递呼吸链(electron transport respiratory chain)。

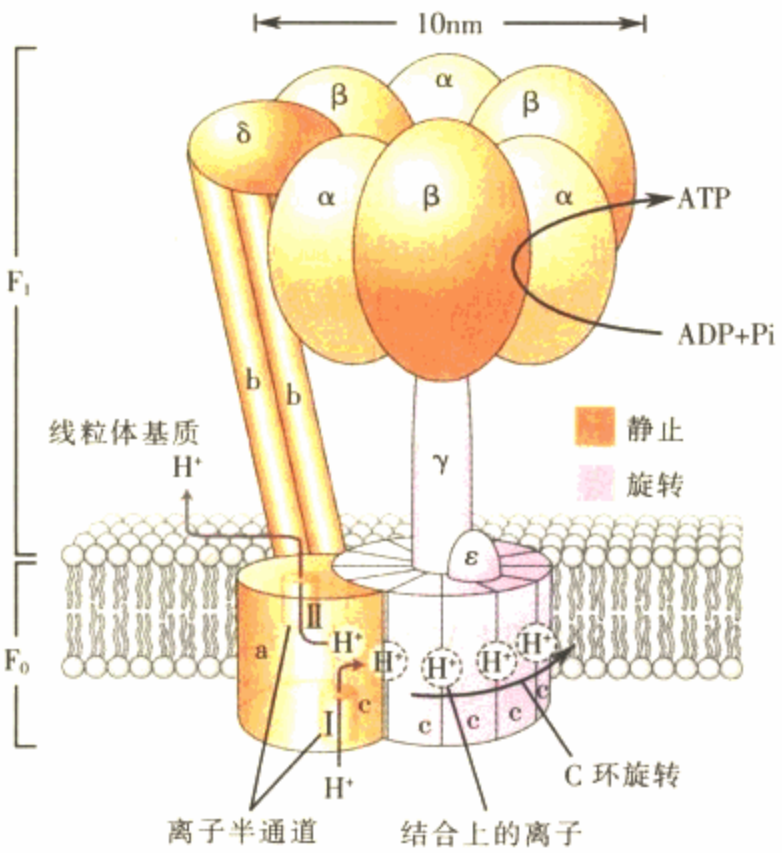
只传递电子的酶和辅酶称为电子传递体，它们可分为醌类、细胞色素和铁硫蛋白三类化合物；既传递电子又传递质子的酶和辅酶称为递氢体。除了泛醌（辅酶 Q，CoQ）和细胞色素 c（Cyt c）之外，呼吸链其他成员分别组成了Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ四个脂类蛋白质复合体，它们是线粒体内膜的整合蛋白（表 6-2）。CoQ 是脂溶性的蛋白质，可在脂双层中从膜的一侧向另一侧移动；Cyt c 是膜周边蛋白，可在膜表面移动。

2. ATP 合酶复合体　线粒体内膜（包括嵴）的内表面并不是光滑的，其上附有许多圆球形基粒。基粒由头部、柄部和基片 3 部分组成：头部呈球形，直径约 8~9nm；柄部直径约 4nm，长 4.5~5nm；头部与柄部相连凸出在内膜表面，柄部则与嵌入内膜的基片相连。进一步研究表明，基粒是将呼吸链电子传递过程中释放的能量用于使 ADP 磷酸化生成 ATP 的关键装置，是由多种多肽构成的复合体，其化学本质是 ATP 合酶复合体，也称 F_0F_1 ATP 合酶（图 6-13）。

（1）头部：又称耦联因子 F_1，是由五种亚基组成的 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ 多亚基复合体，分子量 360 000。纯化的 F_1 可催化 ATP 水解，但其自然状态下（通过柄部与基片相连）的功能是

表 6-2　线粒体电子传递链组分

复合体	酶活性	分子量	辅基
Ⅰ	NADH-CoQ 氧化还原酶	850 000	FMN、FeS
Ⅱ	琥珀酸- CoQ 氧化还原酶	97 000	FAD、FeS
Ⅲ	$CoQH_2$-细胞色素 c 氧化还原酶	280 000	血红素 b、FeS 血红素 c1
Ⅳ	细胞色素 c 氧化酶	200 000	血红素 a、Cu 血红素 a3



●图 6-13　ATP 合酶复合体分子结构示意图

合成 ATP。α、β、δ 三种亚基较大，α、β 可能是表现活性的主要部分；δ 则与基片膜蛋白相结合，作为耦联因子 F_0 与 F_1 相耦联的门户；γ、ε 亚基较小，也与 F_0 相连。F_1 因子可被 F_1 抑制蛋白（F_1 inhibitory protein）结合从而抑制 ATP 的合成。

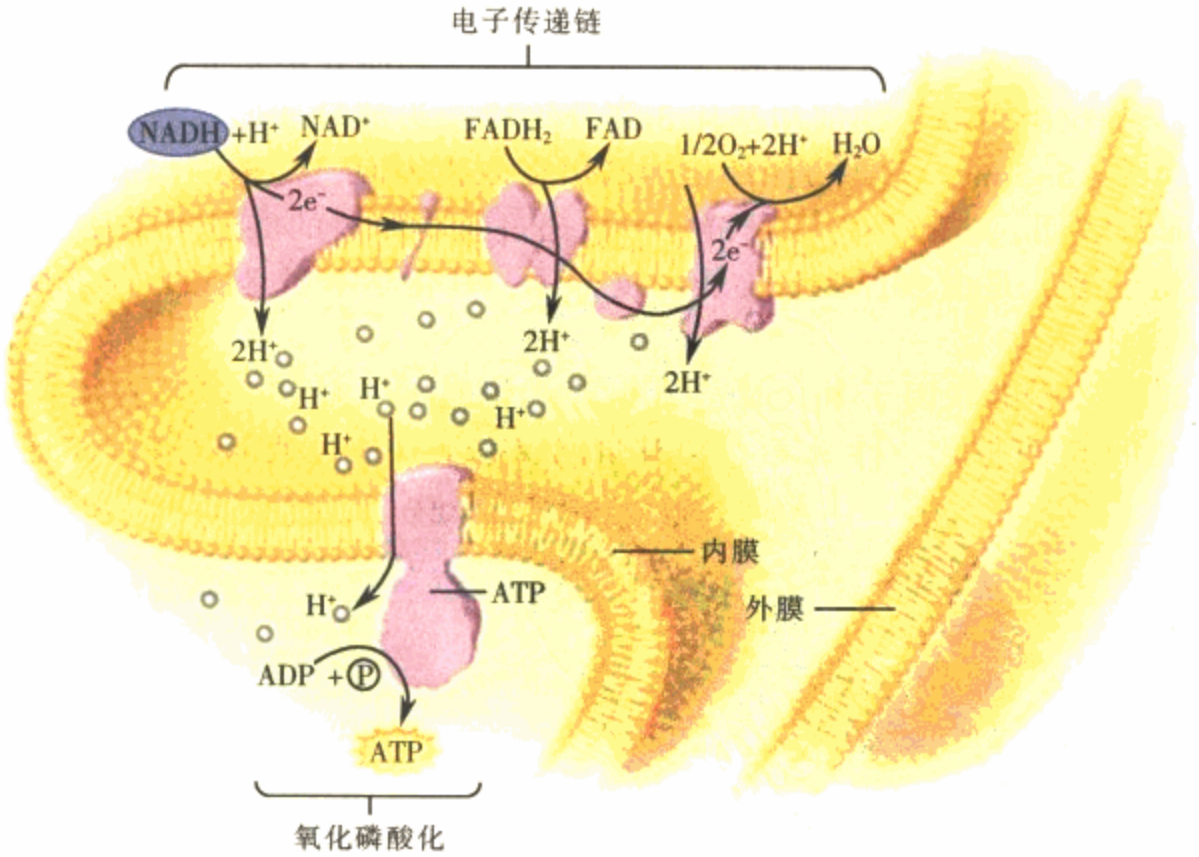
（2）柄部：这是一种对寡霉素敏感的蛋白质（OSCP），相对分子量 18 000。OSCP 能与寡霉素特异结合并使寡霉素的解耦联作用得以发挥，从而抑制 ATP 合成。

（3）基片：又称耦联因子 F_0，是由至少 4 种多肽组成的疏水蛋白，相对分子量 70 000。其亚基类型与组成在不同物种中差别很大。F_0 镶嵌于内膜的脂双层中，不仅起连接 F_1 与内膜的作用，而且还是质子（H^+）流向 F_1 的穿膜通道。

（二）氧化过程伴随磷酸化的耦联

经糖酵解和三羧酸循环产生的 NADH 和 $FADH_2$ 是两种还原性的电子载体，它们所携带的电子经线粒体内膜上的呼吸链逐级定向传递给 O_2，本身则被氧化（图 6-14）。电子传递过程中释放出的能量被 F_0F_1ATP 酶复合体用来催化 ADP 磷酸化而合成 ATP，这就是氧化磷酸化作用。

在正常情况下，氧化水平总是和磷酸化水平密切耦联的，没有磷酸化就不能进行电子传递。根据对相邻电子载体的氧化还原电位的测定表明，呼吸链中有 3 个主要的能量释放部位，即 NADH→FMN，Cyt b→Cyt c 之间，Cyt a→O_2 之间。这 3 个部位释放的能量依次为 50 800J、41 000J 和 99 500J，每个部位裂解所释放的能量都足以使一分子 ADP 磷酸化生成一个分子的 ATP。载氢体 NADH 和 $FADH_2$ 进入呼吸链的部位不同，所释放的自由能也有差异。1 分子 NADH+H^+经过电子传递，释放的能量可以形成 3 分子 ATP；而1 分子 $FADH_2$ 所释放的能量则能够形成 2 分子 ATP。



●图 6-14　电子传递与氧化磷酸化过程

综上所述，葡萄糖完全氧化所释放的能量主要通过两条途径形成 ATP：①底物水平磷酸化生成 4 分子 ATP，其中在糖酵解和三羧酸循环中分别生成 2 分子 ATP；②氧化磷酸化生成 34 个 ATP 分子。在葡萄糖的氧化过程中，一共产生 12 对 H，其中的 10 对以NAD^+为载氢体、2 对以 FAD 为载氢体进入电子传递链，经氧化磷酸化作用可生成 34 个 ATP 分子。因此，1 分子葡萄糖完全氧化共可生成 38 分子 ATP，其中仅有 2 分子 ATP 是在线粒体外通过糖酵解形成的。葡萄糖有氧氧化的产能效率大大高出无氧酵解的能量利用效率。

（三）电子传递时 H^+ 穿膜形成电化学梯度

关于电子传递同磷酸化的耦联机制至今尚未彻底阐明，曾先后有过许多假说，目前被广泛接受的是英国化学家 P. Mitchell（1961）提出的化学渗透假说（chemiosmotic coupling hypothesis）。该假说认为氧化磷酸化耦联的基本原理是电子传递中的自由能差造成 H^+ 穿膜传递，暂时转变为横跨线粒体内膜的电化学质子梯度（electrochemical proton gradient）。然后，质子顺梯度回流并释放出能量，驱动结合在内膜上的 ATP 合酶，催化 ADP 磷酸化合成 ATP。这一过程可综合如下：①NADH 或 $FADH_2$ 提供一对电子，经电子传递链，最后为 O_2 所接受；②电子传递链同时起 H^+ 泵的作用，在传递电子的过程中伴随着 H^+从线粒体基质到膜间腔的转移；③线粒体内膜对 H^+ 和 OH^-具有不可透性，所以随着电子传递过程的进行，H^+ 在膜间腔中积累，造成了内膜两侧的质子浓度差，从而保持了一定的势能差；④膜间腔中的 H^+ 有顺浓度返回基质的倾向，能借助势能通过 ATP 酶复合体 F_0 上的质子通道渗透到线粒体基质中，所释放的自由能驱动 F_0F_1 ATP 合酶合成 ATP。

化学渗透假说有两个特点，一是需要定向的化学反应；二是突出了膜的结构。该学说可以解释氧化磷酸化过程中的许多特性，也得到了很多实验结果的支持。但是也仍存在一些难以用化学渗透假说解释的实验结果，因此还必须不断地修改和完善。相继有人提出了一些新的理论，包括变构假说、碰撞假说等，但都存在一定的问题。目前，争论的焦点集中在电化学质子梯度如何驱动 H^+-ATP 酶复合体的问题上。

经典实验：化学渗透假说的提出

背景知识

到了 20 世纪 50 年代，所有的研究都已经证明氧化磷酸化的过程涉及到电子经过一系列的传递，最后达到分子氧的过程。但是从这些电子传递反应中获得了电子的氧是如何转换为能量分子 ATP 的仍然是个谜。在糖酵解过程中，ADP 可以吸收某些中间化合物的高能磷酸键转换成 ATP，因此推测在电子传递过程中可能会产生一个中间产物进而驱动 ATP 的生成。因此在 20 世纪 50~60 年代期间，寻找这种带有高能磷酸键的中间产物成了这一领域的中心课题，但遗憾的是并没有发现这类物质的存在；相反，另一些证据显示磷酸化过程与“膜”有密切的关系，并且这一过程可以被一些破坏膜结构的化学物质所阻断。鉴于此，Peter Mitchell 提出了“跨膜电化学梯度驱动 ATP 形成的能量耦联机制”。

实验内容

化学渗透假说的基本观点是：“跨膜的质子电化学梯度”将电子传递与 ATP 形成耦联起来。Mitchell 提出电子的转运产生了质子电化学梯度，而质子按势能的跨膜回流驱动了 ATP 的合成。这一假说解释了为什么未能找到所谓的高能“中间”化合物，以及膜的完整性对 ATP 合成的必要性，但这与当时化学界普遍观点并不相符。在 1961 年发表的论文中，Mitchell 用哲学的观点阐述他的这一革命性假说：生物化学家们普遍接受的观点是代谢是膜转运的原因；而他提出的假说则认为代谢和膜转运互为因果，不仅

代谢可以导致膜转运的发生，而且转运也可以启动膜代谢。

发表论文

Peter Mitchell （University of Edinburgh，Edinburgh，Scotland）：

Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by Chemiosmotic Type of Mechanism. Nature，1961，191：144-148

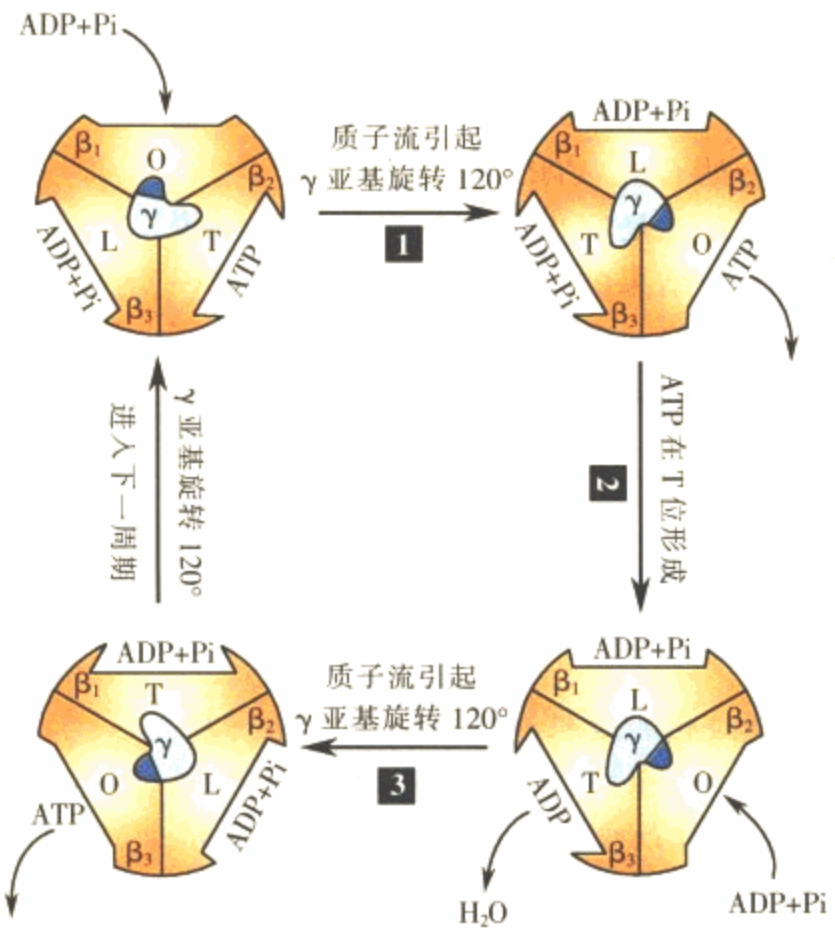
后续影响

Mitchell 的假说被争论了数年，但随后越来越多的研究逐步证实了这一假说，并被生物学界所接受，假说也变成了理论。现在，这一理论不仅解释了 ATP 的合成，而且也解释了通过分解 ATP 而驱动物质的跨膜转运这一生物学机制。

Mitchell 因此于 1978 年获得了诺贝尔奖。

（四）电化学梯度所包含的能量转换成 ATP 的化学能

ADP 和 Pi 在 F_0F_1ATP 合酶的催化下合成 ATP，可是 F_1 因子究竟如何利用 H^+ 的电化学梯度势能使 ADP 和无机磷酸间建立共价键形成 ATP，这仍是一个谜。Paul D. Boyer（1989）提出了结合变构机制（binding-change mechanism）来解释 F_1 因子在 ATP 合成中的作用过程（图 6-15）。他认为当质子穿过 F_1 因子的活性部位时可引起 F_1 颗粒的构象变化，导致底物（ADP 和 Pi）同活性部位的紧密结合和产物（ATP）的释放。在此模型中，ADP 和 Pi 合成 ATP 的反应不需要能量，而 F_1 构象变化时要依赖能量供应，所需的能量一方面是用来使 ATP 同活性部位的结合由紧密状态变为疏松状态，便于释放 ATP；另一方面使ADP 和 Pi 同活性部位的结合由疏松变为紧密以利于 ADP 同 Pi 发生反应合成 ATP，Boyer 因此获得了 1997 年的诺贝尔化学奖。



●图 6-15　ATP 合成的结合变构机制

氧化磷酸化所需的 ADP 和 Pi 是细胞质输入到线粒体基质中的，而合成 ATP 则要输往线粒体外，可是线粒体内膜具有高度不透性，因此这些物质进出线粒体需要依靠专门的结构。线粒体内膜上有一些专一性转运蛋白同这些物质进出线粒体有关，例如其中的一种为腺苷酸转移酶能利用内膜内外 H^+ 梯度差把 ADP 和 Pi 运进线粒体基质，而把 ATP 输往线粒体外。

第四节　线粒体与细胞死亡

一系列的实验显示线粒体参与对细胞死亡的控制：①不管死亡细胞的类型是什么，也不管导致细胞死亡的因素是什么，细胞死亡（包括凋亡和坏死）的共同特征是在细胞死亡前都有线粒体膜通透性改变（mitochondrial permeability transition）；②相对于其他细胞生物学指标（包括 caspase）而言，线粒体通透性的改变是预测细胞死亡更有价值的指标；③加大原凋亡效应物（proapoptotic effectors）的作用剂量可通过作用于线粒体膜而诱导线粒体膜通透性的改变；④Bcl-2 家族中抑制凋亡的成员能与线粒体膜蛋白产生交叉反应，通过其抑

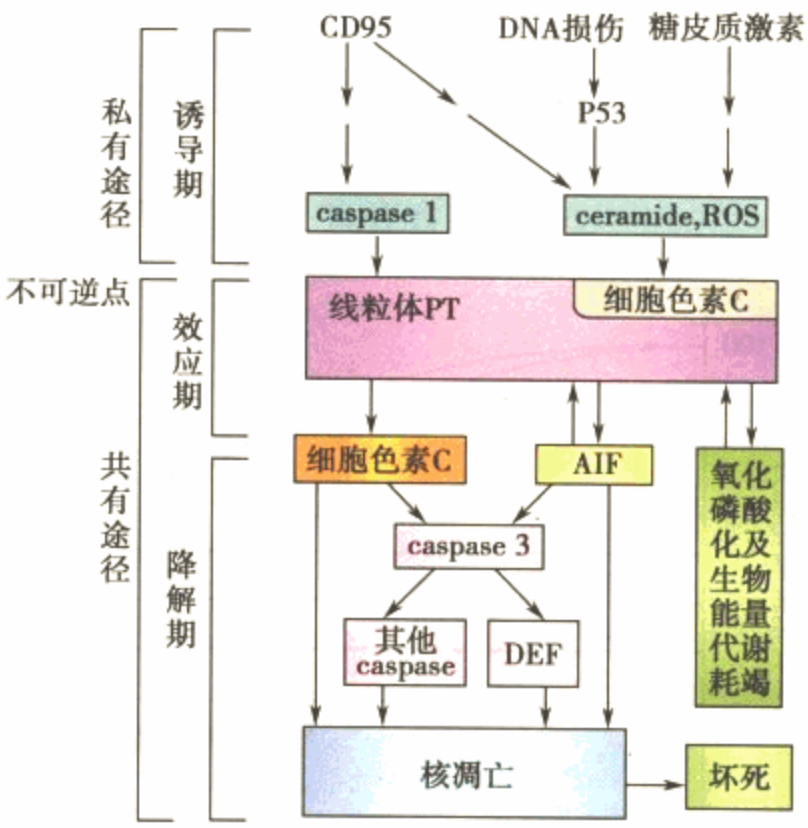
制线粒体膜通透性而抑制细胞凋亡；⑤通过特异性药物抑制线粒体膜的通透性可阻止或延缓细胞死亡。这些研究都说明线粒体构成了导致细胞死亡的一个或几个关键步骤。

一、与细胞死亡有关的线粒体机制

线粒体在能量代谢和自由基代谢中占据十分重要的地位，线粒体产生大量超氧阴离子，并通过链式反应形成活性氧（reactive oxygen species，ROS），当ROS水平较低时，可促进细胞增生；而当ROS水平较高时，使得线粒体内膜非特异性通透性孔道（mitochondrial permeability transition pore，MPTP）开放，不仅导致跨膜电位崩溃，也使细胞色素c外漏，再启动caspase的级联活化，最终由caspase-3启动凋亡。

二、线粒体控制细胞死亡的假说

根据线粒体在控制细胞死亡中所起的重要的作用，有学者提出了与线粒体有关的细胞死亡的三个时限（phase）（图6-16）：一是线粒体前期（premitochondrial phase），这是诱导细胞死亡的因子通过信号转导途径级联传递或损伤途径被激活的过程，因此也称为诱导期（induction phase）或起始期（initiation phase），由于不同的诱导因子有不同的作用途径，所以这一时期也属于私有途径（private pathway）；二是线粒体期（mitochondrial phase），在这一时期线粒体膜的通透性发生改变，这是线粒体控制细胞死亡的关键时期，一旦进入这一点（point-of-no-return），细胞将不可避免地发生后续过程，故也称为效应期（effector phase）或决定期（decisive phase）；三是线粒体后期（postmitochondrial phase），也称为降解期（degradation phase），从线粒体释放的蛋白质，激活蛋白酶和核酸酶，后者进一步介导后续的死亡机制。由于第二期和第三期是不同因素导致细胞死亡的共同途路，因此也称为共有途径（common pathway）。



●图6-16　与线粒体介导细胞死亡有关的三个时限

然而，细胞的死亡并不是简单的过程，而是涉及一个交互作用的复杂机制。它既取决于死亡信号的类型，也取决于死亡信号的强度。有时线粒体途径是细胞死亡的主要途径；有时则是次要途径；有时可能是若干途径之一。了解这一点，不仅有助于对细胞死亡的认识，也有助于临床上疾病的治疗。

第五节　线粒体与医学

线粒体通过合成ATP而为细胞提供能量，调节细胞质的氧化-还原（redox）状态，也是细胞内氧自由基产生的主要来源，后者则与细胞的许多生命活动有关。因此维持线粒体结构与功能的正常，对于细胞的生命活动至关重要。而在特定条件下线粒体与疾病的发生有着密切的关系，一方面是疾病状态下线粒体作为细胞病变的一部分，是疾病在细胞水平上的一种表现形式；另一方面线粒体作为疾病发生的主要动因，是疾病发生的关键，主要

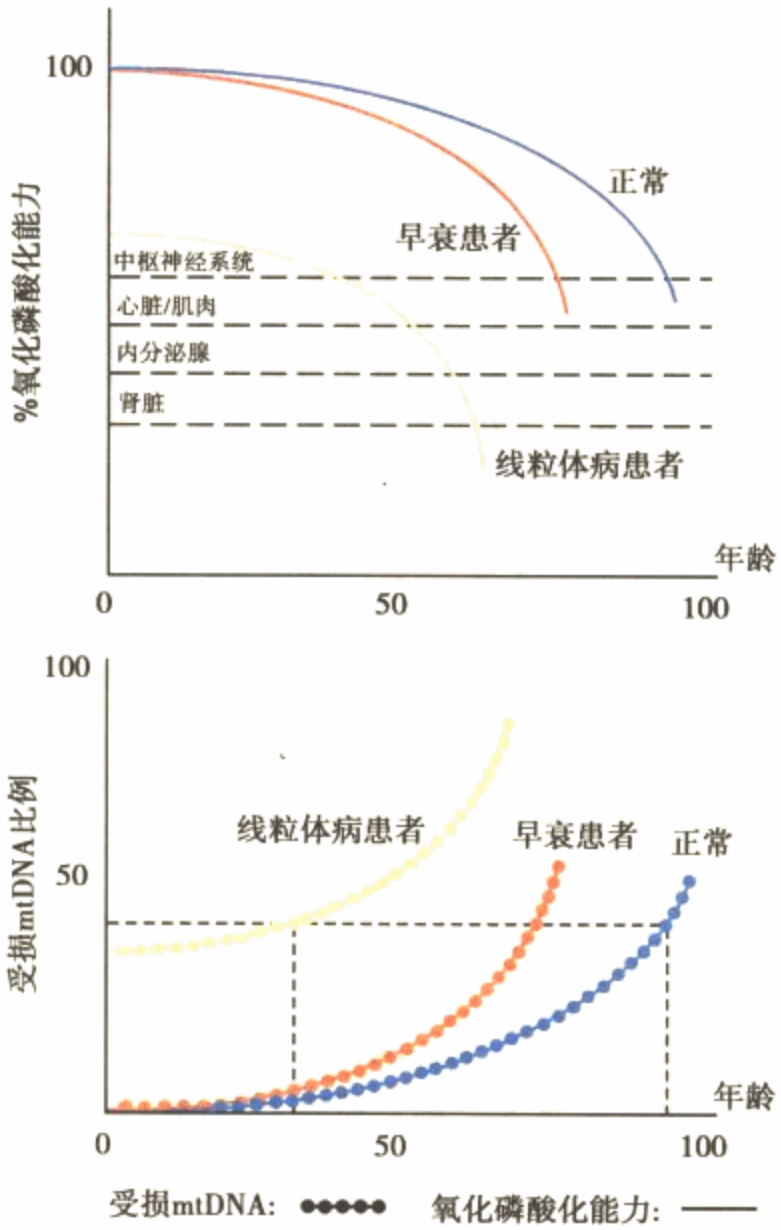
表现为 mtDNA 突变导致细胞结构和功能异常。

一、疾病过程中的线粒体变化

线粒体对外界环境因素的变化很敏感，一些环境因素的影响可直接造成线粒体功能的异常。例如在有害物质渗入（中毒）、病毒入侵（感染）等情况下，线粒体亦可发生肿胀甚至破裂，肿胀后的体积有的比正常体积大 3~4 倍。如人体原发性肝癌细胞癌变过程中，线粒体嵴的数目逐渐下降而最终成为液泡状线粒体；缺血性损伤时的线粒体也会出现结构变异如凝集、肿胀等；坏血病患者的病变组织中有时也可见 2~3 个线粒体融合成 1 个大的线粒体的现象，称为线粒体球；一些细胞病变时，可看到线粒体中累积大量的脂肪或蛋白质，有时可见线粒体基质颗粒大量增加，这些物质的充塞往往影响线粒体功能甚至导致细胞死亡；如线粒体在微波照射下会发生亚微结构的变化，从而导致功能上的改变；氰化物、CO 等物质可阻断呼吸链上的电子传递，造成生物氧化中断、细胞死亡；随着年龄的增长，线粒体的氧化磷酸化能力下降（图 6-17）等等。在这些情况下，线粒体常作为细胞病变或损伤时最敏感的指标之一，成为分子细胞病理学检查的重要依据。

二、mtDNA 突变与疾病

线粒体含有自身独特的环状 DNA，但其 DNA 是裸露的，易发生突变且很少能修复；同时线粒体功能的完善还依赖于细胞核和细胞质的协调。当突变线粒体 DNA 进行异常复制时，机体的免疫系统并不能对此予以识别和阻止，于是细胞为了将突变的线粒体迅速分散到子细胞中去，即以加快分裂的方式对抗这种状态，以减轻对细胞的损害，但持续的损害将最终导致疾病的发生。这类以线粒体结构和功能缺陷为主要疾病原因的疾病常称为线粒体疾病（mitochondrial disorders）。



● 图 6-17　线粒体病患者的 mtDNA 状态与氧化磷酸化能力

线粒体疾病主要影响神经、肌肉系统，所以有时也统称为线粒体脑肌病（mitochondrial encephalomyopathy），但不同的疾病，或同一疾病不同的个体都有不同的临床表现。由于 mtDNA 全序列已经被弄清楚，利用现代生物学技术可以使线粒体疾病得到明确诊断。

线粒体疾病的治疗尚待突破。目前线粒体疾病治疗的基本措施包括：补充疗法、选择疗法和基因疗法。所谓补充疗法是给患者添加呼吸链所需的辅酶，目前运用较广泛的是辅酶 Q，其在线粒体脑肌病（Kearns-Sayre syndrome）、心肌病及其他呼吸链复合物缺陷的线粒体病的治疗中都有一定作用，同时在对缓解与衰老有关的氧化/抗氧化平衡异常也发挥了功效。另外，辅酶 Q、L-肉胆碱、抗坏血酸（维生素 C）、2-甲基萘醌（维生素 K_3）和二氯乙酰酸也能暂时缓解部分线粒体病的症状。所谓选择

疗法是选用一些能促进细胞排斥突变线粒体的药物对患者进行治疗以增加异质体细胞中正常线粒体的比例，从而将细胞的氧化磷酸化水平升高至阈值以上。一种可能的药物是氯霉素，作为 ATP 合成酶的抑制剂，连续低剂量使用此药能促进对缺陷线粒体的排斥。所谓基因治疗是尝试将正常的线粒体基因转入患者体内以替代缺陷 mtDNA 发挥作用。现在认为有 3 种基因治疗方法可行，即胞质 mtDNA 表达法、线粒体转染法和异质性细胞正选择法。

小结

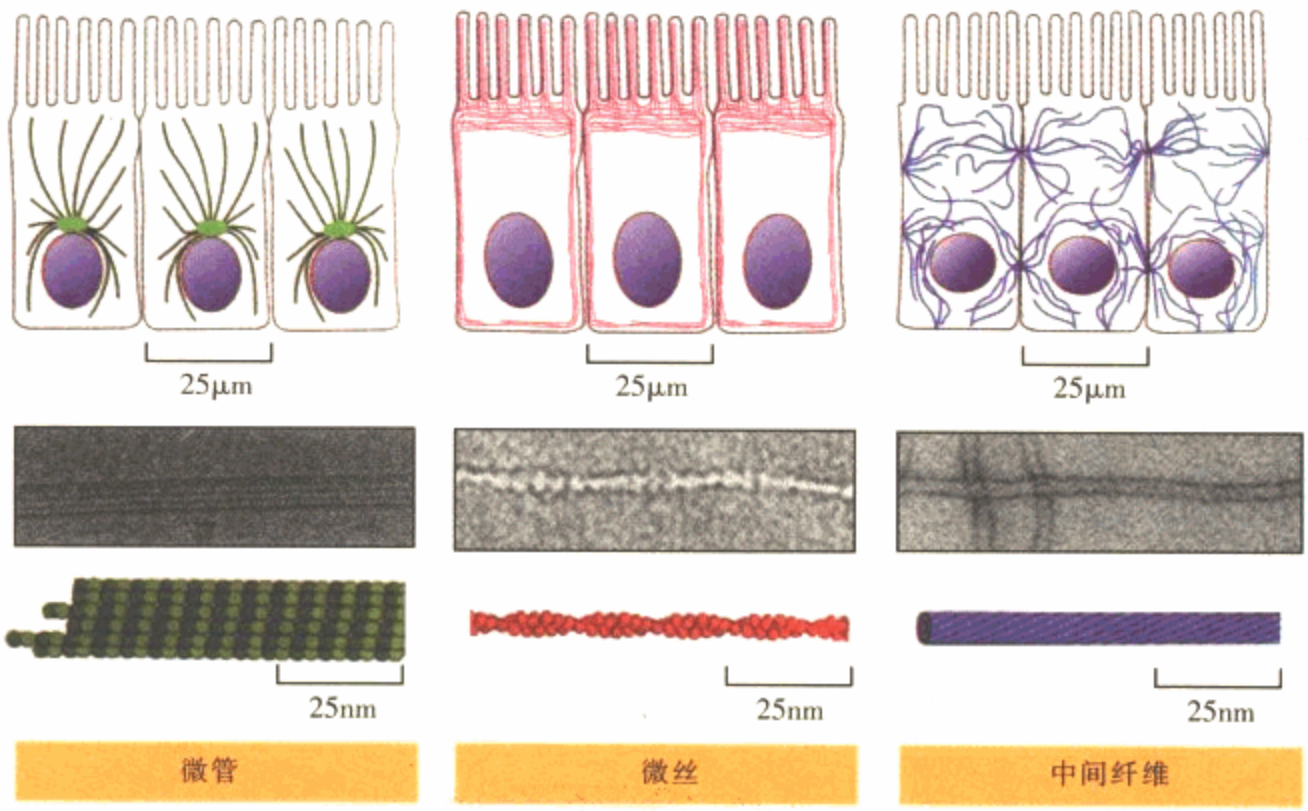
细胞能量的摄取、转换、储存与利用是细胞新陈代谢的中心问题，正常的细胞能量代谢使细胞内部形成一个协调的系统。线粒体是细胞内参与能量代谢的主要结构，它由双层单位膜构成，内膜上分布着具有电子传递功能的蛋白质系统和使 ADP+Pi 生成 ATP 的 ATP合酶复合体；线粒体还具有自己相对独立的遗传体系，但又依赖于核遗传体系，所以具有半自主性。线粒体基质进行着复杂的物质代谢，主要特点是脱氢和脱羧。脱下的氢由受氢体携带至线粒体内膜的电子传递链上传递，最后将电子交给氧，而质子则转移至膜间腔，质子在内膜两侧所形成的电梯度和浓度梯度足以使 ATP 合酶复合体通过特定的机制合成细胞的能量分子——ATP。ATP 分子作为能量 “货币”，实现供能与耗能间的能量流通，完成包括生物合成、肌肉收缩、神经传导、体温维持、细胞分裂、生物发光、细胞膜主动运输等在内的一系列细胞内部活动和整体的功能，以维持细胞整体的生存。在病理状态下，细胞能量代谢会发生崩溃，从而导致细胞内部的结构、功能改变，甚至引发临床疾病的发生。因此，探讨细胞的能量代谢已经成为生物学、医学的热点之一。

（左　伋）

第七章　细胞骨架与细胞的运动

细胞骨架（cytoskeleton）是指真核细胞质中的蛋白质纤维网架体系，它对于细胞的形状、细胞的运动、细胞内物质的运输、染色体的分离和细胞分裂等均起着重要的作用。20世纪50年代，在超薄切片的电子显微镜观察中首次看到了微管。但是由于以往电镜制样一般采用锇酸或高锰酸钾低温固定细胞，导致骨架系统的大部分结构遭到了破坏，直到1963年采用戊二醛并在室温下固定的方法后，才广泛地观察到各类骨架纤维的存在，真正把它们当作一类细胞器并正式命名为细胞骨架。细菌体内不存在细胞骨架，因此细胞骨架的发生可能是真核细胞进化的决定性因素。

细胞骨架的多功能性依赖于三类蛋白质纤维（图7-1），它们分别是微管、微丝及中间纤维。每一种纤维由各自的蛋白质亚单位形成，三类骨架成分既分散地存在于细胞中，又相互联系形成一个完整的骨架体系。该体系是一个高度动态结构，可随着生理条件的改变不断进行组装和去组装，并受各种结合蛋白的调节以及细胞内外各种因素的调控。早期的细胞骨架研究主要是形态观察和细胞内分布和定位，近年来对细胞骨架的研究已从形态观察为主迅速推进到分子水平，骨架蛋白及骨架结合蛋白的结构及功能分析、骨架纤维的动态装配、基因表达调节等成为细胞骨架研究的重要内容。早期发现的细胞骨架主要是指存在于细胞质内的微管、微丝和中间纤维，称为细胞质骨架。后来，又发现细胞核内也存在着细胞骨架，称为细胞的核骨架。



●图7-1　细胞骨架的三种类型

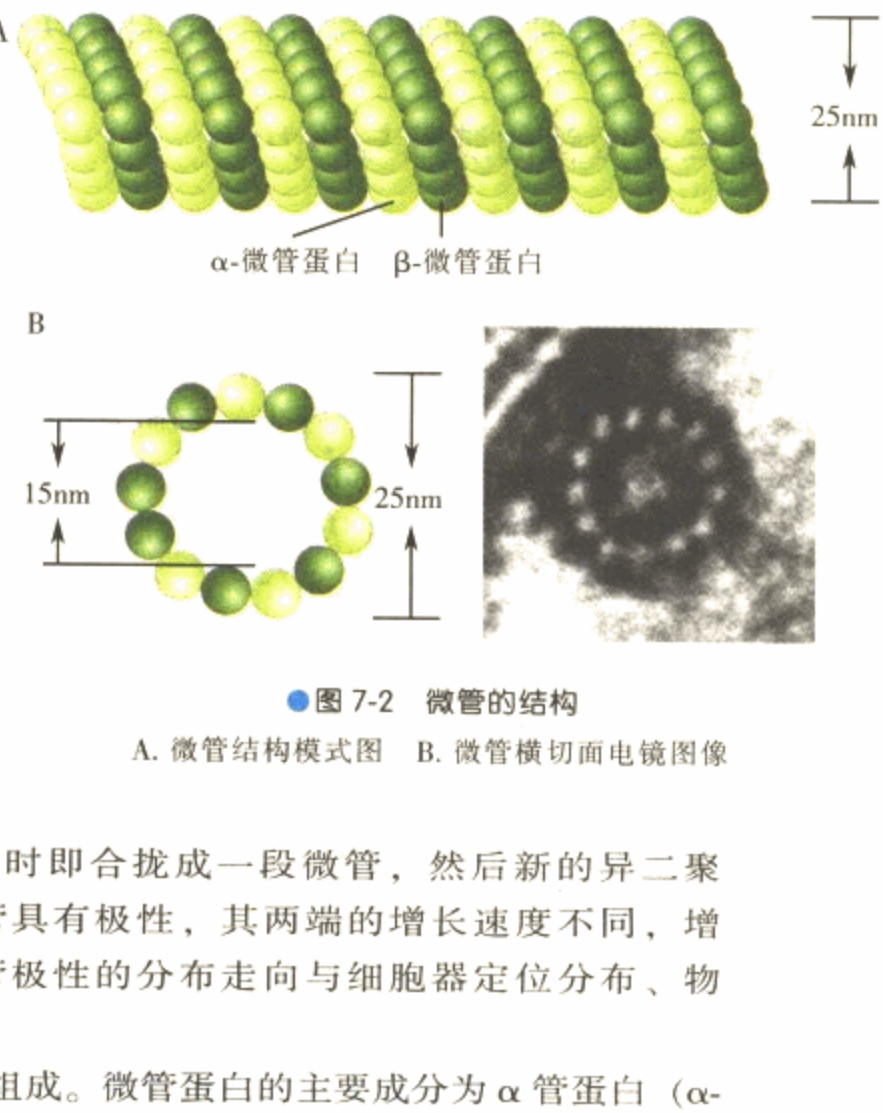
上图：细胞骨架在细胞内的分布；中图：电镜下的细胞骨架结构；

下图：根据电镜结果绘制的细胞骨架结构模式图

第一节　微　　管

微管（microtubule）是真核细胞中普遍存在的细胞骨架成分之一，它是由微管蛋白和微管结合蛋白组成的中空圆柱状结构，在不同类型细胞中有相似结构。微管主要存在于细

胞质中，控制着膜性细胞器的定位及胞内物质运输。微管还能与其他蛋白质共同装配成纤毛、鞭毛、基体、中心体、纺锤体等结构，参与细胞形态的维持、细胞运动和细胞分裂等。本节着重介绍微管的结构，并讨论它们的聚合与解聚的调控机制及微管的功能。



●图 7-2　微管的结构

A. 微管结构模式图　B. 微管横切面电镜图像

一、微管蛋白与微管的结构

微管存在于所有的真核细胞中，以脊椎动物的脑组织最多。微管是直径为 24~26nm 的中空小管（图 7-2），内径约为 15nm，壁厚约 5nm。微管以微管蛋白 α、β 异二聚体为基本构件。微管中微管蛋白二聚体头尾相接形成原纤维，再经过原纤维的两端和侧面增加二聚体扩展成为片层，当片层达到 13 根原纤维时即合拢成一段微管，然后新的异二聚体再不断增加到微管的两端使之不断延长。微管具有极性，其两端的增长速度不同，增长速度快的一端为正端，另一端则为负端。微管极性的分布走向与细胞器定位分布、物质运输方向等微管功能密切相关。

微管由微管蛋白（也称管蛋白，tubulin）分子组成。微管蛋白的主要成分为 α 管蛋白（α-tubulin）和 β 管蛋白（β-tubulin），约占微管总蛋白含量的 80%~95%，近年来人们又发现了微管蛋白家族的第三个成员——γ 微管蛋白，该成员定位于微管组织中心（microtubule organizing center，MTOC），对微管的形成、微管的数量和位置、微管极性的确定及细胞分裂起重要作用。

微管在细胞中有三种不同的存在形式：单管、二联管和三联管。单管由 13 根原纤维组成，是细胞质中主要的存在形式，分散或成束分布，但不稳定，易受低温、钙离子等因素的影响而发生解聚。二联管由 A、B 两根单管组成，A 管有 13 根原纤维，B 管有 10 根原纤维，与 A 管共用 3 根原纤维，主要分布于纤毛和鞭毛内。三联管由 A、B、C 三根单管组成，A 管有 13 根原纤维，B 管和 C 管均由 10 根原纤维组成，分别与 A 管和 B 管共用 3 根原纤维，主要分布于中心粒及鞭毛和纤毛的基体中。二联管和三联管是比较稳定的微管结构。

二、微管结合蛋白

在细胞内，微管除了含有微管蛋白外，还含有一些同微管相结合的辅助蛋白，这些蛋白质总是与微管共存，参与微管的装配，称为微管结合蛋白（microtubule associated protein，MAP），它们不是构成微管壁的基本构件，而是在微管蛋白装配成微管之后，结合在微管表面的辅助蛋白。一般认为，微管结合蛋白由两个区域组成：一个是碱性的微管结合区域，该结构域可与微管结合，可明显加速微管的成核作用；另一个是酸性的突出区域，以横桥的方式与其他骨架纤维相连接，突出区域的长度决定微管在成束时的间距大小。

微管结合蛋白主要包括 MAP-1，MAP-2，tau 和 MAP-4，前三种微管结合蛋白主要存在于神经元中。MAP-4 在神经元和非神经元细胞中均存在，在进化上具有保守性。

不同的微管结合蛋白在细胞中有不同的分布区域，执行特殊功能。这在神经细胞中表现尤为突出，用特异性微管结合蛋白荧光抗体可显示神经细胞中微管结合蛋白的分布差异：tau 只存在于轴突中，而 MAP-2 则分布于胞体和树突中。神经细胞微管结合蛋白的分

布差异与神经细胞树突和轴突区域化以及感受、传递信息有关。

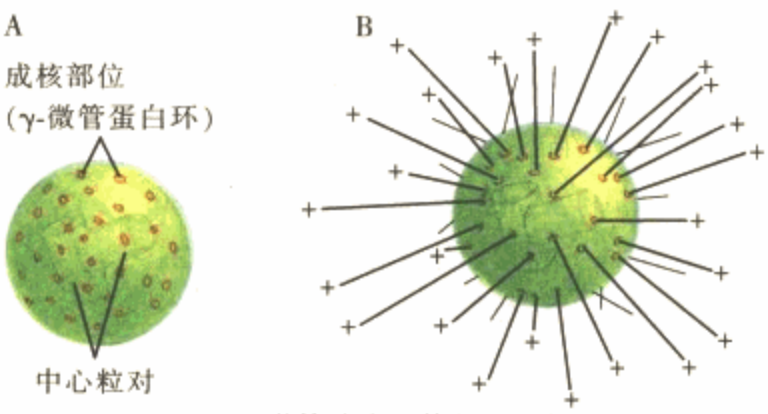
三、微管的装配与动力学

除了特化细胞的微管外，大多数微管都是不稳定的，能够很快地组装或去组装。自发现微管以来，对微管蛋白如何组装成微管提出了一系列理论模型，以描述微管蛋白组装成微管的动力学性质。但目前普遍认为，微管的装配主要表现为动态不稳定性（dynamic instability），即增长的微管末端有微管蛋白-GTP 帽（tubulin-GTP cap），在微管组装期间或组装后 GTP 被水解成 GDP，从而使 GDP-微管蛋白成为微管的主要成分。微管蛋白-GTP 帽及短小的微管原纤维从微管末端脱落则使微管解聚。

微管的装配过程可分为三个时期：成核期、聚合期和稳定期。成核期（nucleation phase）又称为延迟期（lag phase），在该期 α 和 β 微管蛋白聚合成短的寡聚体（oligmer）结构，即核心形成，接着二聚体在其两端和侧面增加使之扩展成片状带，当片状带加宽至 13 根原纤维时，即合拢成一段微管。由于该期是微管聚合的开始，速度较慢，为微管聚合的限速过程，因此称为延迟期。聚合期（polymerization phase）又称延长期（elongation phase），该期中细胞内高浓度的游离微管蛋白聚合速度大于解聚速度，新的二聚体不断加到微管正端，使微管延长，直至游离的微管蛋白浓度降低，解聚速度逐渐增加。在稳定期（steady state phase）又称为平衡期（equilibrium phase），胞质中游离的微管蛋白达到临界浓度，微管的组装（聚合）与去组装（解聚）速度相等。

（一）微管装配的起始点是微管组织中心

微管聚合从特异性的核心形成位点开始，这些核心形成位点主要是中心体和纤毛的基体，称为微管组织中心（图 7-3）。微管组织中心的主要作用是帮助大多数细胞质微管装配过程中的成核（nucleation），微管从微管组织中心开始生长，这是细胞质微管装配的一个独特的性质，即细胞质微管的装配受统一的功能位点控制。微管的核心形成是微管组装的限速过程，在微管动力学中具有重要作用。γ-微管蛋白环形复合体（γ-tubulin ring complex，γ-TuRC）可形成一含有 10~13 个 γ-微管蛋白分子的环形结构，与微管具有相同直径。体外研究表明，γ-微管蛋白复合体可刺激微管核心形成，并包裹微管负端，阻止微管蛋白的渗入。γ-微管蛋白复合体除影响微管的成核作用外，还可能影响微管从中心粒上释放。中心体（centrosome）是动物细胞中决定微管形成的一种细胞器，包括中心粒（centriole）和中心粒旁物质（pericentriolar material）。在细胞间期，位于细胞核的附近，在有丝分裂期，位于纺锤体的两极。如果用秋水仙素使微管解聚，可以观察到在秋水仙素撤除之后，微管从中心体长出。新生微管从中心体发出星形结构称为星状体（aster），继而伸长达到细胞的边沿，直到再形成原有的微管网架为止。



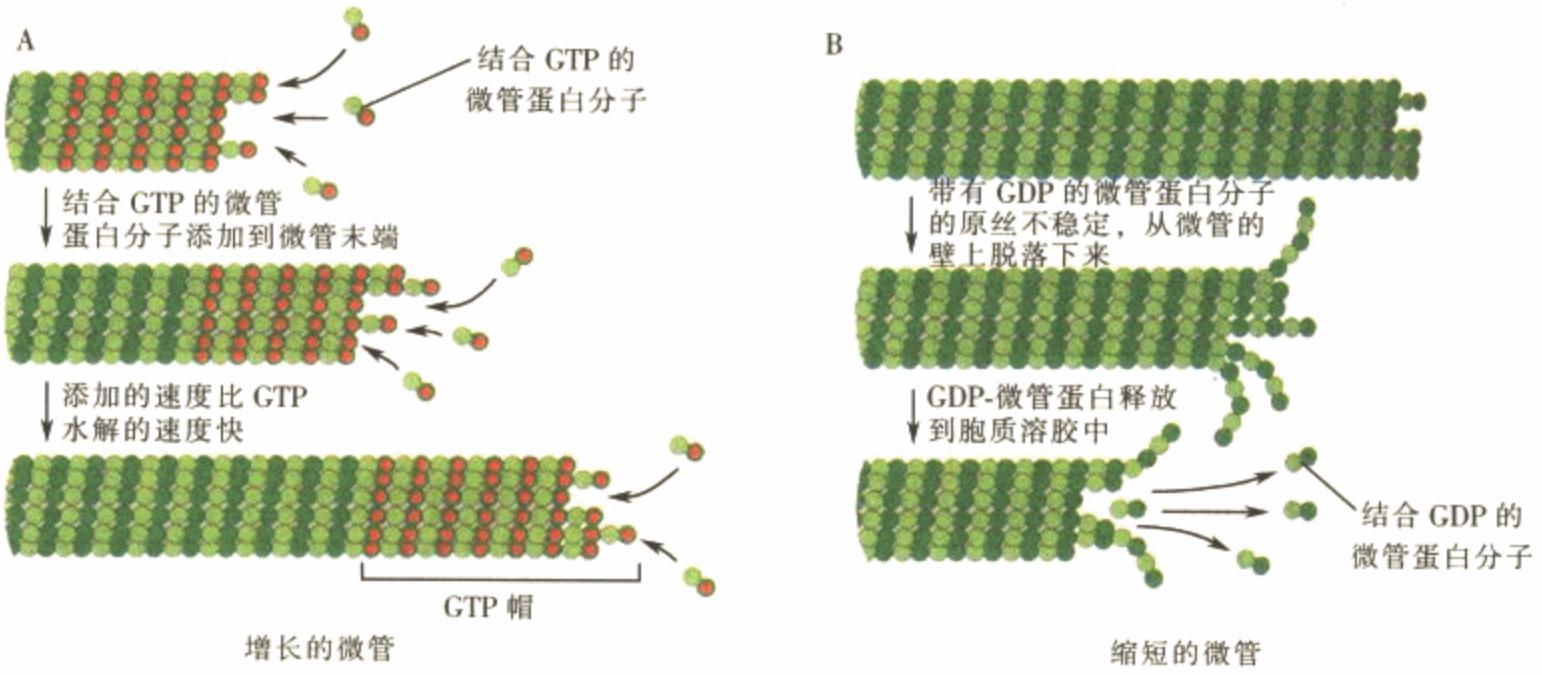
●图 7-3　微管蛋白在中心体上的聚合

A. 由一对中心粒、无定型蛋白基质以及 γ-微管蛋白共同组成的中心体　B. 中心体与附着其上的微管

（二）微管的体外装配

在适当的条件下，微管能进行自我装配，其装配受到微管蛋白的浓度、pH 和温度的影响。微管动态不稳定性行为的发生需要水解 GTP 提供能量，因此，GTP 是调节微管体外组装的主要物质。在影响微管聚合的主要条件中，尤以微管蛋白的浓度及 GTP 的存在最为重要。在体外，只要微管蛋白异二聚体达到一定的临界浓度（约为 1mg/ml），在有 Mg^{2+} 存在

（无Ca^{2+}）、适当的 pH（pH6.9）和温度（37℃）的缓冲液中，异二聚体即聚合成微管。同时需要由 GTP 提供能量，α/β-微管蛋白异二聚体同 GTP 结合后而被激活，引起微管蛋白分子的构象呈直线型，从而使异二聚体聚合成微管，而 GTP 则分解为 GDP 和 Pi。当微管蛋白的聚合迅速进行时，微管蛋白分子添加到微管上的速度大于它们所携带的 GTP 水解速度，因此新生成的微管上全是 GTP-微管蛋白亚基。正因为 GTP-微管蛋白亚基之间结合得比较牢固，结果在微管末端形成一个称为 GTP 帽的结构，它可防止微管的解聚。当微管生长较慢时，GTP 帽中的亚基会在新的携带有 GTP 的亚基结合上来以前，就水解它自己的 GTP 成 GDP，这样就失去 GTP 帽，携有 GDP 的亚基由于对微管聚合体的结合不紧密而很快从游离端上释放出来，这样微管就不停的缩短。因此，当微管两端的微管蛋白具有 GTP 帽（与 GTP 结合）时，微管继续组装；而具有 GDP 帽（与 GDP 帽结合）时，将改变异二聚体的构象使原纤维弯曲而不能形成微管的管壁，微管则趋向于解聚（图 7-4）。细胞内微管的这两种状态（组装和解聚）是不断发生的，因为细胞内不断有微管解聚，又不断有新微管的组装。



●图 7-4　GTP 与微管聚合

原纤维中异二聚体亚单位重复排列具有极性，使细胞内所有由微管构成的结构也具有极性。在一定条件下，微管两个端点的装配速度不同，表现出明显的极性。微管的一端发生 GTP 和微管蛋白的添加，使微管不断延长，称为正端；而在另一端具有 GDP 的微管蛋白发生解聚而使微管缩短，则为负端，微管的这种装配方式又称为踏车运动（treadmilling）。

（三）微管的体内装配

在细胞内微管形成时，γ-TuRC 存在于微管组织中心，γ-TuRC 就像一颗种子，成为更多异二聚体结合上去的核心，微管从此生长、延长。α/β 微管蛋白异二聚体结合到 γ-TuRC 上，通过微管蛋白彼此间相互作用而稳定，形成一短的微管。由于 γ-TuRC 像帽子一样戴在微管的负端而使微管负端稳定。γ-TuRC 组织微管形成的能力可能受细胞周期调节的影响而开闭。最明显的模式是：在间期组织微管形成的能力被关闭，而在 G_2 期到 M 期的转换时期，一种涉及到细胞周期调节的激酶可能使 γ-微管蛋白或 γ-TuRC 中的某些蛋白质磷酸化，从而开放 γ-TuRC 组织形成微管的能力。

（四）很多因素影响微管组装和解聚

造成微管不稳定性的因素很多，包括 GTP 浓度、压力、温度、pH、离子浓度、微管蛋白临界浓度、药物等。有些微管特异性药物在微管结构与功能研究中起重要作用，这些药物主要有：紫杉醇（taxol）、秋水仙素（cochicine）和长春新碱（vinblastine）等。紫杉

醇能和微管紧密结合防止微管蛋白亚基的解聚，加速微管蛋白的聚合作用。秋水仙素能结合和稳定游离的微管蛋白，使它无法聚合成微管，引起微管的解聚作用。长春新碱能结合微管蛋白异二聚体，抑制它们的聚合作用。

四、微管的功能

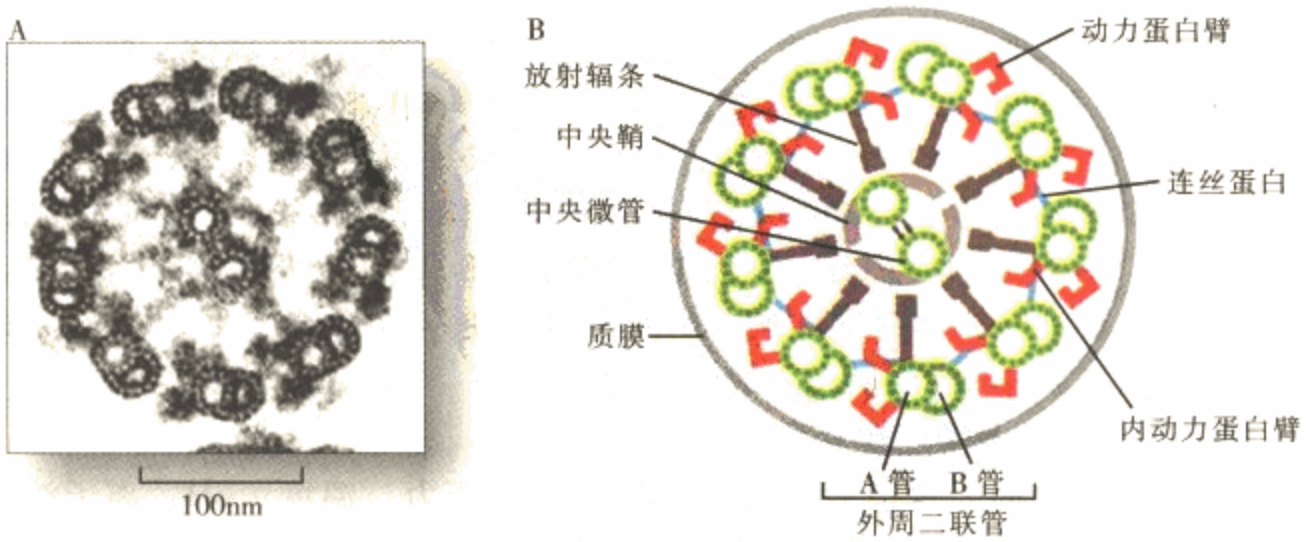
（一）微管构成细胞内的网状支架，支持和维持细胞的形态

维持细胞形态是微管的基本功能。微管本身不能收缩，但具有一定的强度，能够抗压和抗弯曲，这种特性给细胞提供了机械支持力。例如在血小板中有一束微管环形排列于血小板周围，维持血小板的圆盘形结构。当血小板暴露于低温中，环形微管即消失，血小板变成不规则的球形，但将血小板再加热时，环形微管重新出现，血小板又恢复它的圆盘形结构。秋水仙素、长春新碱等抗分裂剂能与微管蛋白异二聚体中的一个单体特异结合，从而阻止其聚合，使微管解聚，因此这些药物也可使血小板失去其圆盘形结构。这些现象都表明，环形微管是血小板骨架的主要组成部分，它们在血小板中的排列对维持血小板的形状有重要作用。另外，微管对于细胞突起部分，如纤毛、鞭毛、轴突的形成和维持也具有重要作用。

（二）微管参与中心粒、纤毛和鞭毛的形成

在光学显微镜下，中心体位于细胞核附近，由中心粒和中心粒周围物质共同组成。在电镜下，中心粒是由 9 组三联体微管围成的一个圆筒状结构，在各种细胞中基本相同。中心体是动物细胞中主要的微管组织中心。在细胞分裂间期，中心体形成胞质微管，构成细胞骨架的主要纤维系统，一方面作为细胞内物质运输的轨道基础，另一方面对细胞形状的维持和改变也起到必不可少的作用；在 M 期，经过复制的中心体形成纺锤体的两极，指导有丝分裂事件的进行，与纺锤丝的排列和染色体的移动有密切关系。

纤毛（cilia）和鞭毛（flagella）具有运动功能，用来划动其表面的液体，是细胞表面的特化结构。纤毛和鞭毛在来源和结构上基本相同。所不同的是，就一个细胞而论，纤毛短而多，而鞭毛则长而少。纤毛和鞭毛都是以微管为主要成分构成的，并且有特殊的结构形式，大多数属于 9+2 类型。纤毛和鞭毛的横断面电镜观察可见中央有两条微管，称为中央微管。中央微管的外周包围一层蛋白性质的鞘，称为中央鞘（central sheath）。外周则以 9 组二联管围绕。二联管两两之间以微管连接蛋白相连。外周二联管和中央鞘之间也有连接，称为放射辐条（radial spoke）。放射辐条由 A 管伸出，近中央鞘一端膨大，称为辐头。A 管上还伸出动力蛋白臂（dynein arm），其头部具有 ATP 酶活性，可为纤毛与鞭毛的运动提供动力。鞭毛与纤毛的基体（basal body）由三联管组成，与中心粒相似。基体的中央无微管（图 7-5）。



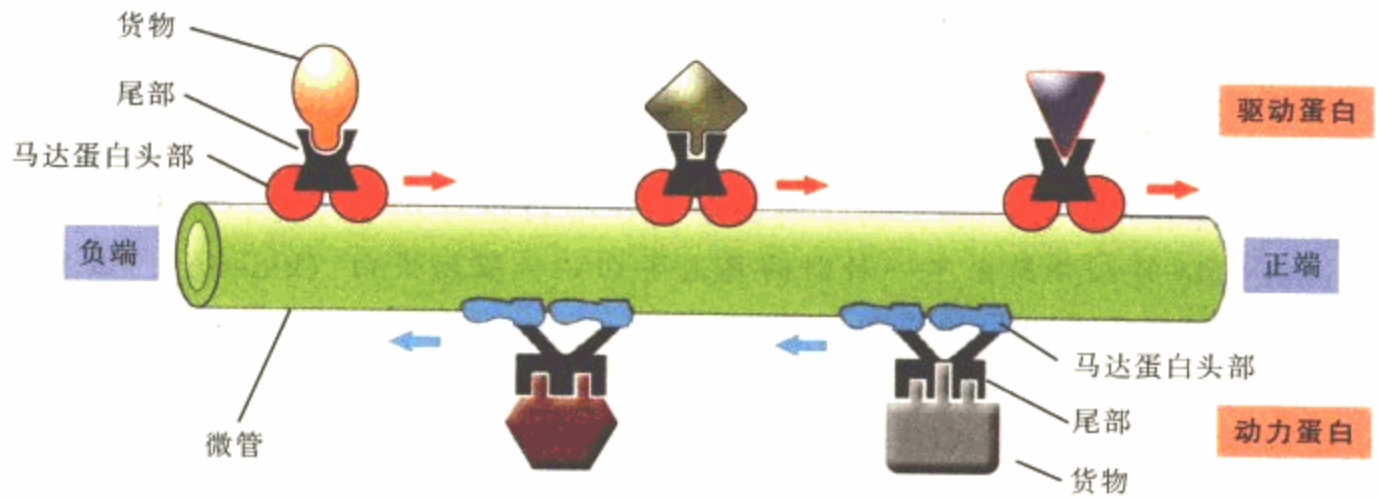
●图 7-5　纤毛与鞭毛的结构

A. 纤毛横切电镜照片　B. 纤毛结构示意图

（三）微管参与细胞内物质运输

微管在核的周围分布密集，并向胞质外周伸展。在线粒体周围也有微管的存在，有的微管直接连到高尔基体小泡上；核糖体可系在微管和微丝的交叉点上。细胞内的细胞器移动和胞质中的物质转运都和微管有着密切的关系。例如，神经细胞合成的蛋白质等物质沿神经轴索快速运送至远端的神经末梢，细胞的分泌颗粒和色素细胞的色素颗粒沿微管运输，线粒体的快速运动也是沿微管进行的。

微管参与细胞内物质运输的任务主要由微管马达蛋白（motor protein）来完成，马达蛋白是指介导细胞内物质沿细胞骨架运输的蛋白（图 7-6）。目前发现有几十种马达蛋白，可以归属于三大家族：动力蛋白（dynein）、驱动蛋白（kinesin）和肌球蛋白（myosin）家族。其中驱动蛋白和动力蛋白是以微管作为运行轨道，而肌球蛋白则是以肌动蛋白纤维作为运行轨道。胞质动力蛋白和驱动蛋白各有两个球状 ATP 结合头部和一个尾部，其头部与微管是以空间结构专一的方式结合的，因此只有当驱动蛋白以正确的姿势“指向”微管时才能结合上去，而马达蛋白的尾部通常是与细胞组分如小泡或细胞器稳定结合的，因此也就决定了马达蛋白所运载的“货物”种类。驱动蛋白和动力蛋白的头部是具有 ATP 水解活性的酶（ATP 酶），这一酶解反应所产生的能量可提供这两者的头部作一个循环的构象改变，完成一套与微管结合、解离、再结合的动作，从而使蛋白沿着微管移动。



●图 7-6　沿微管运输的马达蛋白

驱动蛋白是一类微管激活的 ATP 酶，可沿微管由负端向正端移动，在胞内物质运输中具有重要作用。在神经细胞中，驱动蛋白已被证明沿着轴突的微管“轨道”负责快速轴突运输，线粒体快速移动，分泌小泡前体和各种轴突组成物运输到达神经末梢。动力蛋白是一个由 9~12 个亚基组成的蛋白质复合体，具有 ATP 酶活性，可沿微管由正端向负端移动，为细胞内物质运输和纤毛运动提供动力。间期细胞中胞质动力蛋白的一个主要作用是参与细胞器的定位和转运。

（四）微管维持细胞内细胞器的定位和分布

微管及其相关的马达蛋白在真核细胞内的膜性细胞器的定位上起着重要作用。细胞中线粒体的分布与微管相伴随，游离核糖体附着于微管和微丝的交叉点上，微管使内质网在细胞质中展开分布，使高尔基体在细胞中央靠近细胞核而定位于中心体附近。如果用秋水仙素处理细胞，破坏微管的装配，那么这些细胞器的有序空间排列就会改变。如内质网坍塌，由于内质网与核被膜相联系，于是便积聚到核附近；高尔基体分解成小的囊泡，分散在整个细胞质中。当把秋水仙素去除以后，则细胞器的分布重新恢复正常。

（五）微管参与染色体的运动，调节细胞分裂

微管是构成有丝分裂器的主要成分，可介导染色体的运动。有丝分裂前期，染色体的

动粒（kinetochore）出现并逐渐成熟，当核膜开始崩解时，微管侵入核区，染色体一端的动粒可捕获从纺锤体极伸出的微管，形成侧位连接，并沿着单根微管的侧面向极区方向滑动。由于极区的微管密集，这一运动使动粒容易获得更多的微管。这些微管与动粒形成端位连结，并通过在动粒一端的聚合延伸而推动染色体向纺锤体中部移动。同时另一侧姐妹染色单体上的动粒也与来自另一极的微管结合。有丝分裂后期只有在所有染色体都达到赤道板平衡后才会开始，任何一个染色体未与微管连接或未达到平衡位置，分裂后期都将被延迟。

（六）微管参与细胞内信号传导

已证明微管参与 hedgehog、JNK、Wnt、ERK 及 PAK 蛋白激酶信号转导通路。信号分子可直接与微管作用或通过马达蛋白和一些支架蛋白来与微管作用。微管的信号转导功能具有重要的生物学作用，它与细胞的极化、微管的不稳定动力学行为、微管的稳定性变化、微管的方向性及微管组织中心的位置均有关。

经典实验：驱动蛋白的分离

研究背景

细胞器的运输及其定位机制是细胞生物学的关键性问题。1982 年，Robert Allen 等人应用显微摄影技术观察到，在乌贼神经细胞的轴突中，细胞器可沿胞浆中的细丝进行移动。随后，通过电子显微镜证实这些细丝是微管，但是与微管结合并参与细胞器运输的马达蛋白（motor protein）的性质不清。当时被发现的惟一的一种微管马达蛋白是轴突动力蛋白(axonemal dynein)，而这种微管马达蛋白仅存在于纤毛和鞭毛中。在 1985 年，Ronald Vale 等人分离出了一种新的马达蛋白——驱动蛋白（kinesin），该蛋白触发了细胞中的细胞器沿着微管的移动。

实验内容

以前的体外实验表明，ATP 的存在对微管的运动是必需的，微管的运动可以被 ATP 同型物——腺苷酰亚胺二磷酸（AMP-PNP）所阻断；在 AMP-PNP 存在的情况下，尽管微管的运动被阻断，但细胞器仍然与微管相结合，提示在这种情况下，与细胞器运动相关的马达蛋白也同微管结合。

基于这些知识，为了分离这种未知的马达蛋白，Ronald D. Vale 等在 AMP-PNP 存在的情况下，将微管与从乌贼神经轴突中提取的胞浆蛋白共同孵育，首先使这种未知的马达蛋白与微管相结合，然后在该体系中加入 ATP，ATP 的水解则使该蛋白从微管上解离下来。再经过凝胶过滤分析，就得到了一个分子量为 110kD 的蛋白质。他们用同样方法，还从牛脑中纯化出一种类似的马达蛋白。这些新的蛋白质在酶促动力学和结构方面与先前分离的动力蛋白（dynein）明显不同，是一个新的微管马达蛋白家族成员，他们将其命名为驱动蛋白（kinesin），在希腊语中 kinein 意为“移动（move）”。

发表论文

Ronald D. Vale, Thomas S. Reese, Michael P. Sheetz (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke at the Marine Biological Laboratory, Woods Hole; University of Connecticut Health Center, Farmington; Stanford University School of Medicine, Stanford, USA) Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. Cell, 1985, 42 : 39-50.

后续影响

马达蛋白在囊泡运输和细胞器的运动过程中所发挥的作用是细胞生物学的核心问题之一。后续的实验陆续证实，驱动蛋白使囊泡和细胞器沿着微管向微管正端方向运动，而动力蛋白则使囊泡和细胞器向微管的负端运动。马达蛋白除了负责囊泡运输和细胞器的运动外，对于有丝分裂过程中染色体的分离和重新分布也具有重要作用。驱动蛋白的发现拓展了人们对基于微管运动的真核细胞生命活动机制的认识。

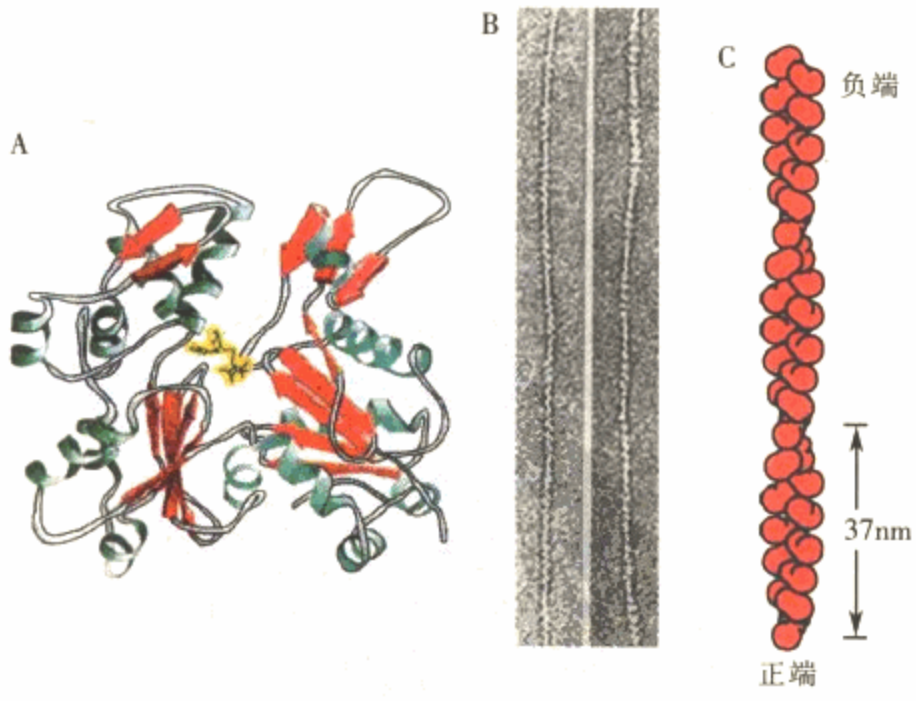
第二节　微　　丝

微丝（microfilament，MF）又称肌动蛋白丝（actin filament），是由肌动蛋白（actin）组成的细丝，普遍存在于真核细胞中，在肌肉细胞中，肌动蛋白占细胞总蛋白的10%，在非肌肉细胞中也占了1%~5%。它以束状、网状或散在等多种方式有序地存在于细胞质的特定空间位置上，并由此与微管和中间纤维共同构成细胞骨架，参与细胞形态维持以及细胞运动等生理功能。和微管一样，微丝是不稳定的，但它在细胞中也能形成如肌肉中的收缩单位一样稳定的结构。微丝与许多种肌动蛋白结合蛋白相结合，使它能够在细胞内行使多种功能。

一、肌动蛋白与微丝的结构

微丝的主要成分是肌动蛋白，在电镜下是一种细丝状结构，直径5~8nm，与微管相比，肌动蛋白微丝更纤细柔顺。单个微丝通常比微管短很多，在细胞内单条微丝并不是独立行动的，而是形成横向连接的聚合物或形成束，这样要比单个微丝更结实。

每一个肌动蛋白分子是由375个氨基酸组成的单链多肽，与一分子ATP紧密相连。肌动蛋白单体外观呈哑铃形，称为G-肌动蛋白（球形-肌动蛋白）。每个G-肌动蛋白由两个亚基组成，它具有阳离子（Mg^{2+}和K^+或Na^+）、ATP（或ADP）和肌球蛋白结合位点。微丝是由G-肌动蛋白单体形成的多聚体，也称为F-肌动蛋白（纤维状-肌动蛋白）。肌动蛋白单体具有极性，装配时首尾相接，故微丝也有极性。肌动蛋白微丝也和微管一样是极性结构，有两个在结构上不相同的末端，相对迟钝和生长慢的负端（minus end）及一个生长快的正端（plus end）（图7-7）。负端又称为“指向端”（point end），正端又称为“秃端”（barbed end）。一个细胞内的微丝总长度比微管总长度长至少30倍以上，反映了这两种细胞骨架聚合体在组装及功能上的差别。



●图7-7　G-肌动蛋白和F-肌动蛋白的结构

A. 肌动蛋白单体（G-肌动蛋白）结构模型　B. F-肌动蛋白电镜照片　C. F-肌动蛋白的结构

二、微丝结合蛋白及其功能

纯化的肌动蛋白在体外能够聚合形成肌动蛋白纤维，但是这种纤维不具有相互作用的能力，也不能行使某种功能。在显微镜下

观察，它们只是杂乱无章的堆积而不像活细胞中肌动蛋白纤维能够组织成各种组织，如束状、薄网状等。体外组装的肌动蛋白纤维本身同活体中的肌动蛋白纤维之间没有差别，只是组织结构不同。体内的肌动蛋白纤维是由不同的肌动蛋白纤维结合蛋白将肌动蛋白纤维组织成各种不同的结构，从而执行不同的功能。

肌细胞和非肌细胞中都有微丝结合蛋白，至少已分离出 100 多种。表 7-1 是常见的几类主要的微丝结合蛋白。目前发现，微丝结合蛋白具有多种功能，但它们与肌动蛋白相互作用的方式却十分简单。这些微丝结合蛋白主要与微丝的装配及微丝的功能有关。

表 7-1　几类常见的微丝结合蛋白

蛋白质	分子质量(kD)	分布
单体隔离蛋白		
抑制蛋白(profilin)	12～15	广泛分布
胸腺素(thymosin)	5	广泛分布
末端阻断蛋白		
β 辅肌动蛋白(β-actinin)	35～37	肾、骨骼肌
CapZ	32,34	肌组织
加帽蛋白(capping protein)	28～31	Acanthamoeba
交联蛋白		
细丝蛋白(filamin)	250	平滑肌
肌动蛋白结合蛋白(ABP)	250	血小板,巨噬细胞
gelactin	23～28	变形虫
成束蛋白		
丝束蛋白(fimbrin)	68	小肠表皮
绒毛蛋白(villin)	95	肠表皮,卵巢
成束蛋白(fascin)	57	海胆卵
α 辅肌动蛋白(α-actinnin)	95	肌组织
纤维切割蛋白		
凝溶胶蛋白(gelsolin)	90	哺乳动物细胞
片段化蛋白/割切蛋白(fragmin/severin)	42	阿米巴虫、海胆
短杆素(brevin)	93	血浆
肌动蛋白纤维去聚合蛋白		
cofilin	21	广泛分布
ADF	19	广泛分布
蚕食蛋白(depactin)	18	海胆卵
膜结合蛋白		
(肌)营养不良蛋白(dystrophin)	427	骨骼肌肉
黏着斑蛋白(vinculin)	130	广泛分布
膜桥蛋白(ponticulin)	17	Dictyostelium

(一) 单体隔离蛋白

抑制蛋白和胸腺素能够与单体肌动蛋白结合，并且抑制它们的聚合，将具有这种作用的蛋白质称为肌动蛋白单体隔离蛋白(monomer sequenstering protein)，这种蛋白质在非肌细胞中负责维持高浓度的单体肌动蛋白。没有单体隔离蛋白，细胞质中可溶性的肌动蛋白几乎全部组装成肌动蛋白纤维。改变细胞质中单体隔离蛋白的浓度或改变它们的活性，就会使细胞质中肌动蛋白单体-聚合体的平衡发生变化，它们的活性和浓度决定着肌动蛋白是趋于聚合还是解聚。

（二）交联蛋白

交联蛋白（cross linking protein）的主要功能是改变细胞内肌动蛋白纤维的三维结构。每一种交联蛋白都有两个或两个以上同肌动蛋白结合的位点，这样，能够使两个或多个肌动蛋白纤维产生交联，使细胞内的肌动蛋白纤维形成网络结构。有些交联蛋白是杆状的，能够弯曲，由这种交联蛋白形成的网络结构具有相当的弹性，因而能够抵抗机械压力。有些交联蛋白是球状的，能够促使肌动蛋白成束排列，如微绒毛中的肌动蛋白束就是靠这种蛋白交联的。

（三）末端阻断蛋白

末端阻断蛋白（end blocking protein）通过同肌动蛋白纤维的一端或两端的结合调节肌动蛋白纤维的长度。加帽蛋白同肌动蛋白纤维的末端结合之后，相当于加上了一个帽子。如果一个快速生长的肌动蛋白纤维在正端加上了帽子，那么在负端就会发生去聚合。某些加帽蛋白能够促使新的纤维形成，同时抑制已存在微丝的生长，这样导致细胞内有大量较短微丝的存在。

（四）纤维切割蛋白

纤维切割蛋白（filament severing protein）能够同已经存在的肌动蛋白纤维结合并将它一分为二。由于这种蛋白质能够控制肌动蛋白丝的长度，因此大大降低了细胞中的黏度。经这类蛋白质作用产生的新末端能够作为生长点，促进肌动蛋白的装配。割断蛋白可作为加帽蛋白封住肌动蛋白纤维的末端。

（五）肌动蛋白纤维解聚蛋白

肌动蛋白纤维解聚蛋白（actin filament depolymerizing protein）主要存在于肌动蛋白丝骨架快速变化的部位，它们同肌动蛋白丝结合，并引起肌动蛋白丝的快速去聚合形成肌动蛋白单体。

（六）膜结合蛋白

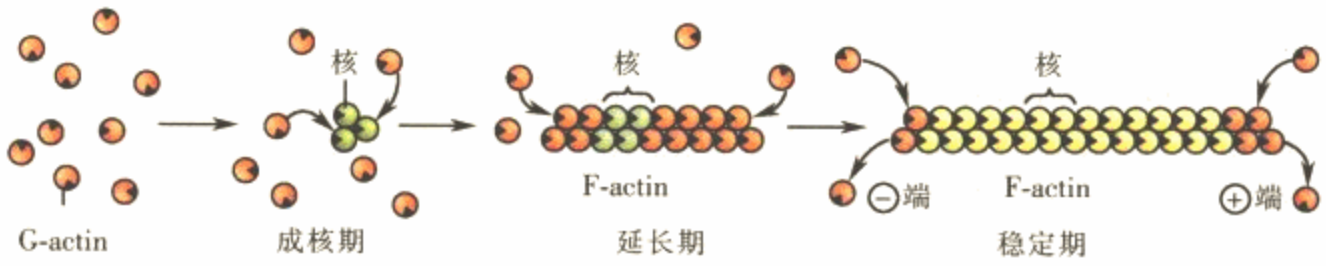
膜结合蛋白（membrane binding protein）是非肌细胞质膜下方产生收缩的机器。在剧烈活动时，由收缩蛋白作用于质膜产生的力引起质膜向内或向外移动（如吞噬作用和胞质分裂）。这种运动是由肌动蛋白纤维直接或间接与质膜相结合后所形成的。直接的方式有同膜整合蛋白的结合，间接的方式有同外周蛋白的结合。两个典型的例子是红细胞膜骨架和细胞的整联蛋白连接。这两种情况下，肌动蛋白丝通过膜结合蛋白与细胞质膜连接成一个网络结构。

三、微丝的装配机制

在多数非肌肉细胞中，微丝是一种动态结构，在一定条件下，不断进行组装和解聚，并与细胞的形态维持及细胞运动有关。

（一）微丝的组装过程分为成核、聚合和稳定三个阶段

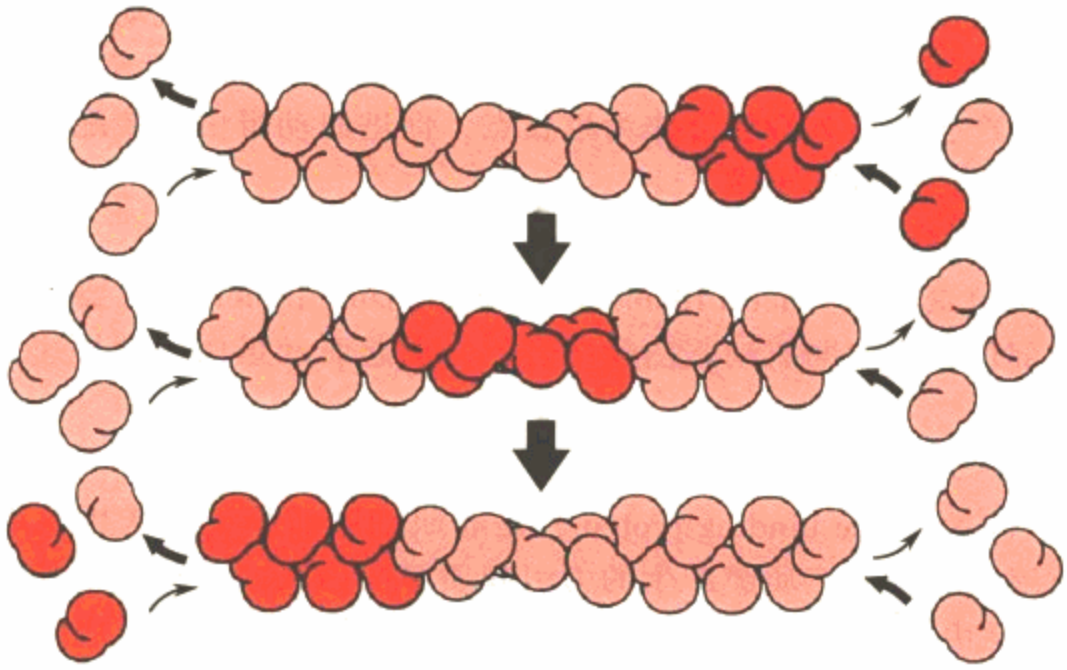
体外实验表明，球形肌动蛋白组装成肌动蛋白纤维需要 ATP 和一定的盐浓度（主要是 Mg^{2+} 和 K^{+}），其组装过程也分三个阶段：即成核期、聚合期和稳定期。成核期是微丝组装的限速过程，需要一定的时间，故又称延迟期，此期球状肌动蛋白开始聚合，其二聚体不稳定，易水解，只有形成三聚体才稳定，即核心形成。一旦核心形成，球状肌动蛋白便迅速地在核心两端聚合，进入聚合期。微丝两端的组装速度有差异，正端的组装速度明显快于负端，约为负端的 10 倍以上。微丝延长到一定时期，肌动蛋白渗入微丝的速度与其从微丝上解离的速度达到平衡，此时即进入平衡期，微丝长度基本不变，正端延长长度等于负端缩短长度，并仍在进行着聚合与解聚活动（图 7-8）。



●图 7-8　微丝组装的基本过程

（二）微丝的组装可用踏车模型和非稳态动力学模型来解释

微丝的组装可用踏车模型和非稳态动力学模型来解释。目前认为踏车模型在微丝组装过程中可能起主导作用。微丝可以在任何一端以添加肌动蛋白单体的方式增长，但由于微丝具有极性，新的肌动蛋白单体加到微丝两端的速度不同，速度快的一端为正端，速度慢的一端为负端，表现出显著的踏车现象。在微丝装配时，肌动蛋白分子添加到肌动蛋白丝上的速率正好等于肌动蛋白分子从肌动蛋白丝上解离的速率时，微丝净长度没有改变，这种过程称为肌动蛋白的踏车行为（图 7-9）。



●图 7-9　踏车行为模式图

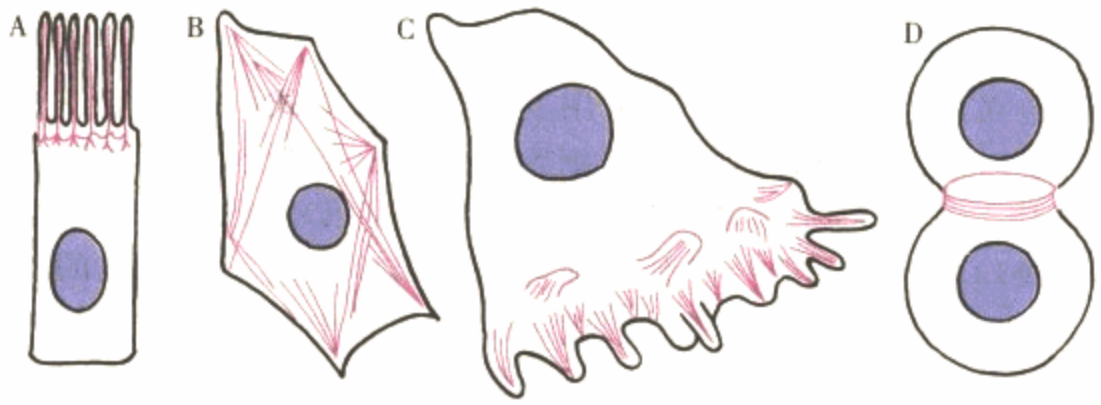
微丝两端聚合加入和解聚释放的亚单位速度达到平衡，微丝长度不变

裸露的微丝就像不带结合蛋白的微管一样，呈固有的不稳定性，而且两端都可以去组装，在解聚时正端的速度比负端的速度要快得多。ATP 主要调节微丝组装的延长期，每一个游离的肌动蛋白单体带有一个紧密结合的 ATP，一旦肌动蛋白单体聚合到肌动蛋白丝上它就水解为 ADP，就像 GTP 对于微管一样，肌动蛋白丝中的 ATP 水解为 ADP，减弱了单体之间的结合力，也就降低了聚合体的稳定性。因此核苷酸的水解促进了解聚，帮助细胞中已形成的微丝去组装。

非稳态动力学模型认为 ATP 是调节微丝组装的动力学不稳定性行为的主要因素。微丝组装的延长期通过 ATP 来调节，一个球状肌动蛋白分子可结合 1 分子 ATP，结合 ATP 的肌动蛋白（即 ATP- 肌动蛋白）对纤维状肌动蛋白末端的亲和性高，当 ATP-肌动蛋白结合到末端后，肌动蛋白的构象发生改变，ATP 水解为 ADP+Pi。ADP-肌动蛋白对纤维末端的亲和性低，容易从末端脱落，使纤维缩短。ATP-肌动蛋白浓度与其聚合速度呈正比，当 ATP-肌动蛋白高浓度时，ATP-肌动蛋白在末端聚合的速度便升高，由于 ADP-肌动蛋白对末端的亲和力小，结果 ADP-肌动蛋白不断从末端解聚脱落，使纤维缩短。因此，就每一根纤维来说，其长度一般不是固定不变的，而是呈动力学不稳定状态，其长度总在延长与

缩短的变化之中。

微丝同微管一样，在体内装配时也有成核作用。所不同的是肌动蛋白纤维的成核作用发生在质膜，因而在很多细胞中肌动蛋白纤维在质膜下的一层由微丝和各种微丝结合蛋白组成的网状结构往往密度较高，称为细胞皮层（cell cortex）或肌动蛋白皮层（actin cortex）。该结构具有很高的动态性，与肌动蛋白一起为细胞膜提供强度和韧性，并维持细胞的形态。如细胞皮层可推动细胞膜形成细长的微刺（microspike），在神经细胞轴突的生长端可形成更长的微穗称丝状伪足（filopodia），还可形成片状伪足（lamellipodia）（图 7-10）。



●图 7-10　细胞中的肌动蛋白束

A. 微绒毛　B. 细胞质中的收缩束　C. 运动细胞前缘的片状伪足和丝状伪足　D. 细胞分裂时的收缩环

（三）微丝的组装受多种因素影响

微丝的装配除了受 G-肌动蛋白临界浓度的影响，还受 ATP、Ca^{2+}、Na^{+}、K^{+}浓度和药物的影响。在含有 ATP 和 Ca^{2+}以及低浓度的 Na^{+}、K^{+}的溶液中，微丝趋于解聚而形成肌动蛋白单体；而在 Mg^{2+}和高浓度的 Na^{+}、K^{+}的溶液中，肌动蛋白单体则装配成微丝。另外，微丝结合蛋白对微丝的组装也有调控作用。

同微管一样，肌动蛋白也受某些药物分子的影响。主要有细胞松弛素 B（cytochalasin B）和鬼笔环肽（phalloidin），它们与肌动蛋白特异性结合，影响着肌动蛋白单体-多聚体的平衡。

细胞松弛素 B 是第一个用于研究细胞骨架的药物，它是真菌分泌的生物碱。细胞松弛素及其衍生物在细胞内通过与微丝的正端结合起抑制微丝聚合的作用。当将细胞松弛素加到活细胞后，肌动蛋白纤维骨架消失，使动物细胞的各种活动瘫痪，包括细胞的移动、吞噬作用、胞质分裂等。它对微管没有作用，也不抑制肌收缩，因肌纤维中肌动蛋白丝是稳定的结构，不发生组装及解聚的动态平衡。鬼笔环肽是从毒蕈（amanita phalloides）分离的毒素，它同细胞松弛素的作用相反，它只与聚合的微丝结合，而不与肌动蛋白单体分子结合。它同聚合的微丝结合后，抑制了微丝的解体，因而破坏了微丝的聚合和解聚的动态平衡。

四、微丝的功能

（一）微丝构成细胞的支架并维持细胞的形态

在细胞中，微丝不能单独发挥作用，必须形成网络结构或束状结构才能发挥作用。细胞的特化结构包括微绒毛（microvilli）和应力纤维（stress fiber）。微绒毛的核心是由 20~30 个同向平行的微丝组成的束状结构，其中有绒毛蛋白和毛缘蛋白（fimbrin），它们将微丝连接成束，赋予微绒毛结构刚性。另外还有肌球蛋白-Ⅰ（myosin-Ⅰ）和钙调蛋白（calmodulin），它们在微丝束的侧面与微绒毛膜之间形成横桥连接，提供张力以保持微丝

束处于微绒毛的中心位置。微绒毛是质膜顶端表面的指状形突起，在小肠吸收上皮细胞最多，使细胞的吸收面积增大 20 倍，对于增强消化和吸收功能具有重要意义。在微绒毛中，由微丝形成的微丝束构成了微绒毛的骨架，另外还有一些微丝结合蛋白，在调节微绒毛长度和保持其形状方面具有重要作用。应力纤维也叫张力纤维，是真核细胞中广泛存在由微丝束构成的较为稳定的纤维状结构，在细胞内紧邻质膜下方，常与细胞的长轴大致平行并贯穿细胞的全长。这些微丝束具有极性，一端与质膜的特定部位相连，另一端插入到细胞质中，或与中间丝结合。应力纤维具有收缩功能，但不能产生运动，而只能用于维持细胞的形状和赋予细胞韧性和强度。

（二）微丝参与细胞运动

许多动物细胞在进行位置移动时多采用变形运动的方式。如变形虫、巨噬细胞和白细胞以及器官发生时的胚胎细胞等，这些细胞含有丰富的微丝，依赖肌动蛋白和微丝结合蛋白的相互作用，可进行变形运动。这些细胞通过肌动蛋白聚合使细胞表面形成突起，如片状伪足或丝状伪足。当片状伪足或丝状伪足接触到一片合适的表面时，它们就黏附在上面，这时称为整合素的跨膜蛋白就与胞外基质中的分子或与另一细胞表面上的分子结合。同时整合素在胞内面紧紧抓住肌动蛋白丝，从而为细胞内部的肌动蛋白丝系统创造了一个牢靠的锚着点。细胞然后通过内部的收缩产生拉力，利用这一锚着点把自己的身体拉向前。

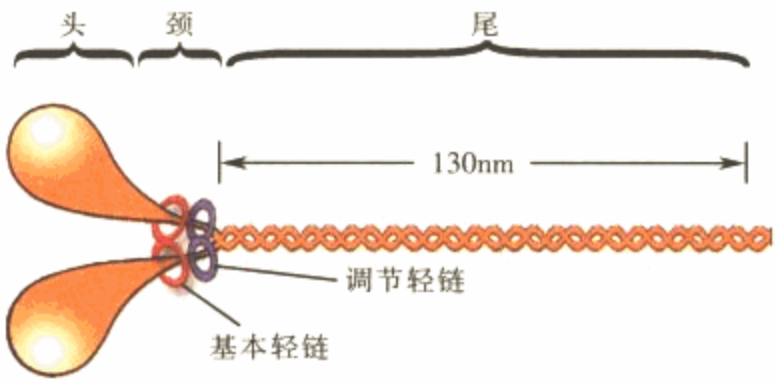
（三）微丝参与细胞分裂

在有丝分裂末期，核分裂完成后，在即将分离的两个子细胞之间肌动蛋白微丝与肌球蛋白-Ⅱ丝往往组装形成瞬时性收缩束以维持特殊的功能，然后解体。最突出的是有丝分裂的动物细胞由微丝与肌球蛋白-Ⅱ丝形成的腰带状束，称为收缩环（contractile ring）（见图 7-10）。细胞周围的 M-时相在质膜内面皮层微丝形成收缩环，收缩产生动力将质膜向内拉，细胞的腰部紧缩最终一分为二完成胞质的分裂过程，把两个细胞分隔开。Ca^{2+} 可能参与调节收缩环的形成，因为依赖 Ca^{2+} 的肌球蛋白-Ⅱ的磷酸化作用将促进其与肌动蛋白之间的相互作用，同时又促进其本身聚合形成短的肌球蛋白双极性丝。

（四）微丝参与肌肉收缩

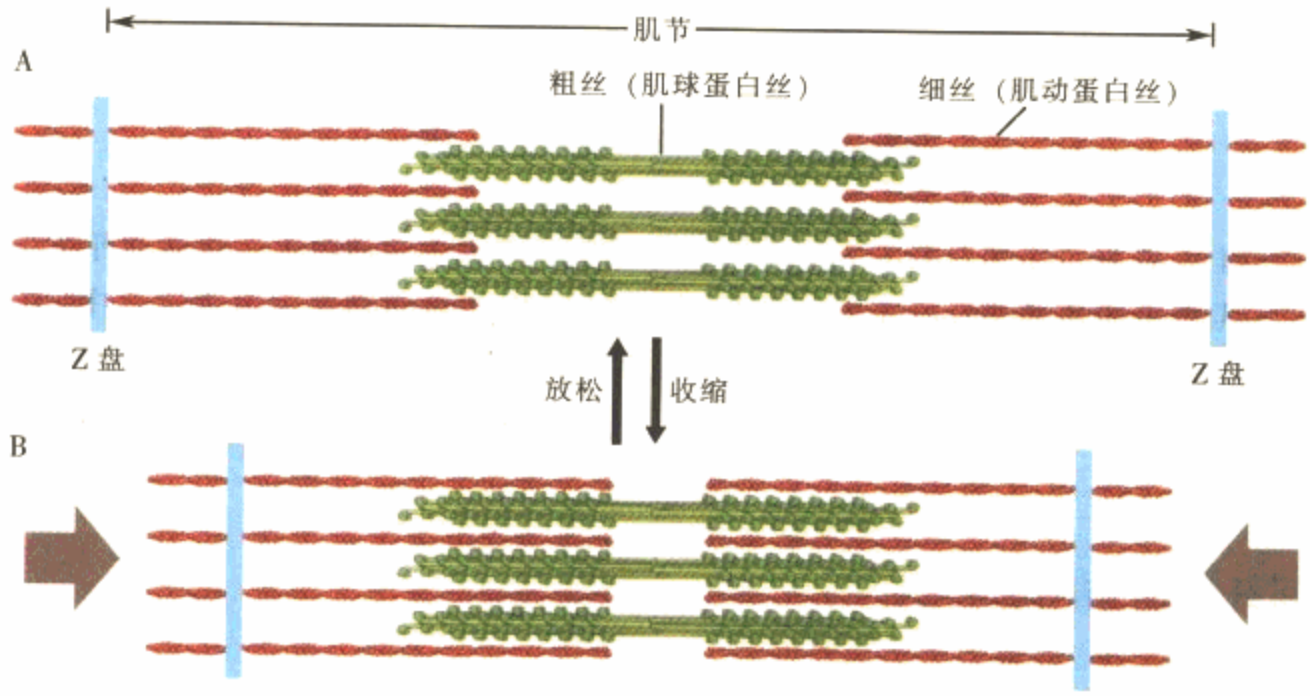
真核细胞中很多与微丝相结合的蛋白都是在肌细胞中首先发现，肌细胞的收缩是实现有机体的一切机械运动和各脏器生理功能的重要途径。

骨骼肌收缩的基本结构单位——肌小节（sarcomere）的主要成分是肌原纤维。电镜下观察证明肌原纤维由粗肌丝（thick myofilament）和细肌丝（thin myofilament）组成。粗肌丝直径约为 10nm，长约 1.5mm，由肌球蛋白（myosin）组成（图 7-11）。细肌丝直径约为 5nm，由肌动蛋白、原肌球蛋白（tropomyosin）和肌钙蛋白（troponin）组成，又称肌动蛋白丝。



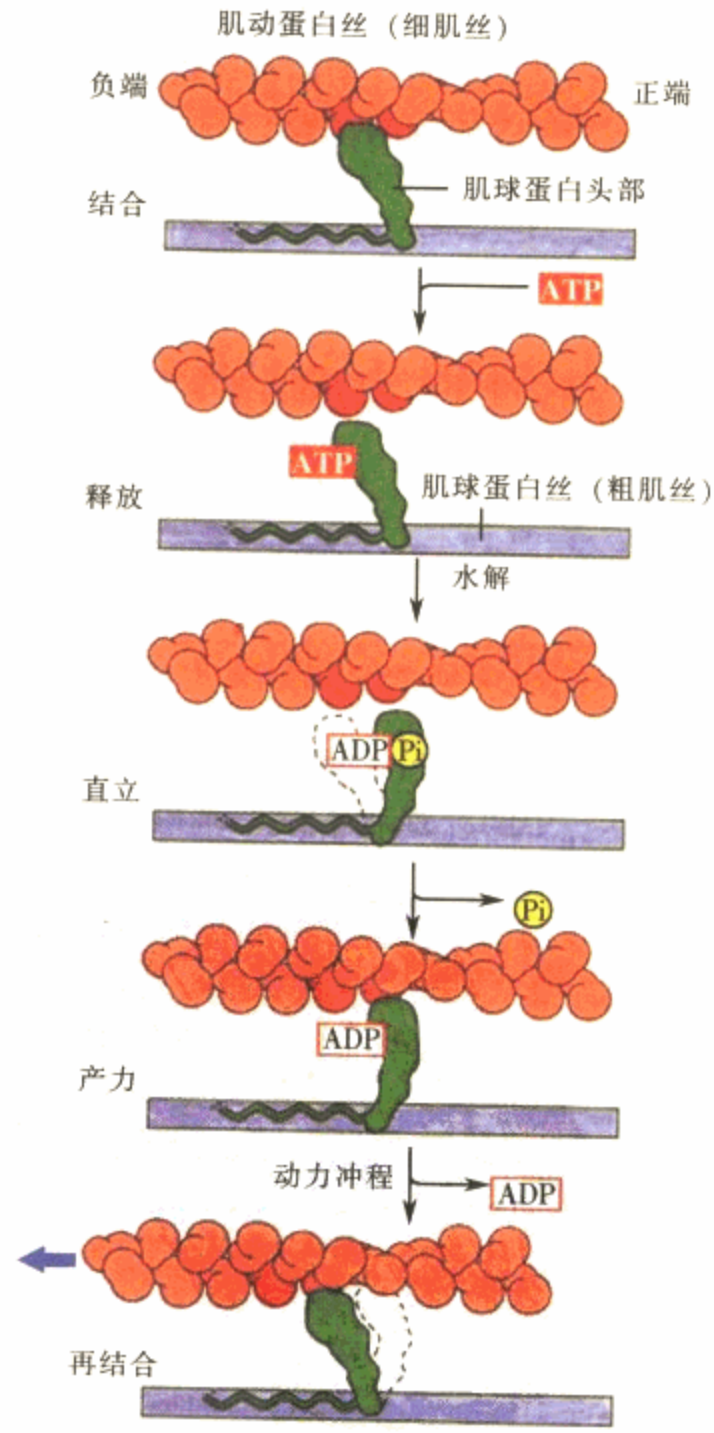
●图 7-11　肌球蛋白分子

myosin 粗丝与肌动蛋白细丝相互交错，myosin 粗丝为双极对称的组装形式，分布在中线两侧肌细胞的收缩机制可用滑动丝模型（sliding filament model）来解释。1954 年 Huxley 提出肌收缩的滑动丝模型，认为肌细胞收缩是由于粗肌丝与细肌丝之间相互滑动的结果。电镜下观察肌小节证明，粗肌丝可伸出横桥（cross bridge）与邻近的细肌丝连接。在肌细胞收缩时，横桥可推动肌动蛋白丝（细丝）和肌球蛋白丝（粗丝）的滑行（图 7-12）。



●图 7-12　肌肉收缩的滑动丝模型

肌细胞收缩最明显的特征是肌球蛋白Ⅱ的头部与邻近的细肌丝结合并发生一系列的构象变化，其变化过程分五个步骤（图 7-13）：①结合（attachment）：即肌球蛋白的头部与肌动蛋白丝（细丝）紧密结合，又称强直构象（rigor conformation）。这一过程非常短暂，因为 ATP 可很快与肌球蛋白结合。②释放（release）：ATP 结合于肌球蛋白头部后可诱导肌动蛋白结合位点上的肌球蛋白发生构象变化，使肌球蛋白头部对细肌丝的亲和力下降。③直立（cocked）：肌球蛋白头部的 ATP 结合位点关闭，启动一明显的构象变化，使 ATP 的头部沿细丝移动约 5μm，在该过程中 ATP 发生水解，但水解产生的 ADP 和 Pi 仍结合在肌球蛋白上。④产力（force generation）：肌球蛋白头部微弱的结合到细丝的一个新结合位点上，释放出无机磷酸（Pi），使肌球蛋白头部与肌动蛋白紧密结合，并产生机械力，使肌球蛋白发生明显的构象变化，肌球蛋白头部结合的 ADP 释放，恢复到原始的构象。⑤再结合（reattachment）：循环到最后，肌球蛋白头部又与细肌丝紧密结合，但此时肌动蛋白头部结合在细肌丝新的位点，并沿着细肌丝正端“行走”了一段距离，从而导致肌肉的收缩。



●图 7-13　肌球蛋白在细肌丝上的移动过程

（五）微丝参与细胞内物质运输

微丝在微丝结合蛋白介导下可与微管一起进行细胞内物质运输，例如小泡的运输，通过肌球蛋白-1 同微丝结合，将小泡沿微丝的负端向正端移动。另外，肌球蛋白-1 的尾部同质膜结合，利用其头部可将微丝从一个部位运向另一个部位。

（六）微丝参与细胞内信号传递

细胞表面的受体在受到外界信号作用时，可触发质膜下肌动蛋白的结构变化，从而启动细胞内激酶变化的

信号传导过程。

第三节　中 间 纤 维

中间纤维（intermediate filaments，IF）广泛存在于真核细胞中，最早在平滑肌细胞内发现，由于其介于肌肉细胞 actin 细丝与肌球蛋白粗丝之间而得名“中间”。中间纤维是三类细胞骨架纤维中结构最为复杂的一种。浓盐溶液与非离子性去污剂处理可使细胞内其余大部分的细胞骨架消失，惟独保留中间纤维，可见中间纤维在三类细胞骨架纤维中是最为坚韧和持久的。

一、中间纤维的结构和类型

（一）中间纤维是丝状蛋白多聚体

中间纤维的直径为 10nm，是一种坚韧的、耐久的蛋白质纤维。它相对较为稳定，既不受细胞松弛素的影响也不受秋水仙素的影响。

中间纤维的单体（亚基）是蛋白质纤维分子，已经发现 50 多种，它们都有共同的结构域：一个 α-螺旋的中间区，两侧是球形的 N 端和 C 端。所有亚基的中间螺旋结构域都是保守的，中间杆状区又分为 4 个螺旋区，它们之间被 3 个间隔区隔开，间隔区也是非常保守的（图 7-14）。亚基装配时靠 α 配对形成二聚体。

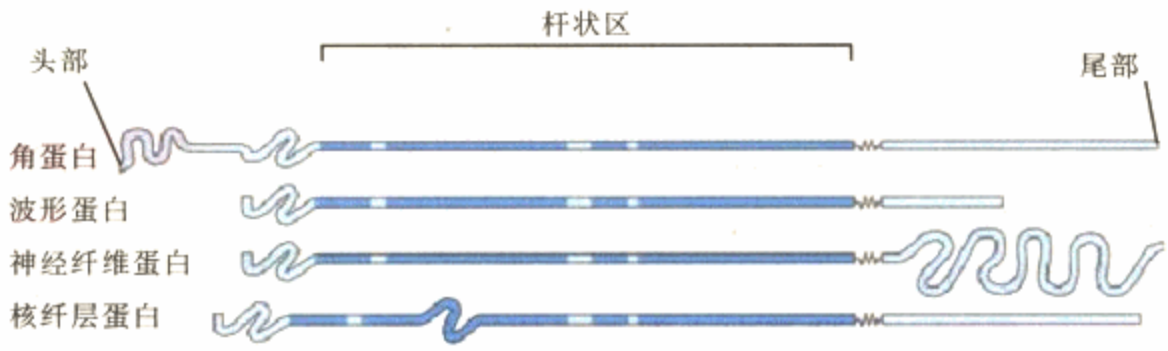


图 7-14　中间纤维蛋白的结构模型

虽然 α-螺旋区是高度保守的，但 N 端的头和 C 端的尾都是高度可变的，不同类型的中间纤维亚基在头部和尾部的大小和氨基酸组成方面有很大区别，具有不同的组成和化学性质。中间纤维分子质量的大小主要取决于尾部的变化，结构的关键区域在于杆状区，它们表现出形成多级螺旋所需的分子形式。

（二）中间纤维蛋白的类型和分布较为复杂

根据中间纤维氨基酸序列的相似性，可分为六种类型（表 7-2）：

表 7-2　脊椎动物细胞内中间纤维蛋白的主要类型及分布

类型	举例	分子质量(kD)	细胞内分布
Ⅰ	酸性角蛋白(acidic keratin)	40～60	表皮细胞
Ⅱ	中性/碱性角蛋白(neural or basic keratin)	50～70	表皮
Ⅲ	波形蛋白(vimentin)	54	成纤维细胞、白细胞及其他细胞
	结蛋白(desmin)	53	肌细胞
	外周蛋白(peripherin)	57	外周神经元

续表

类型	举例	分子质量(kD)	细胞内分布
	胶质原纤维酸性蛋白(glial firillary acidic protein)	51	神经胶质细胞
Ⅳ	神经丝蛋白(neurofilament protein)		
	NF-L	67	神经元
	NF-M	150	神经元
	NF-H	200	神经元
Ⅴ	核纤层蛋白(lamin)		各种类型的细胞
	核纤层蛋白 A	70	
	核纤层蛋白 B	67	
	核纤层蛋白 C	60	
Ⅵ	巢蛋白(nestin)	200	中央神经系统的干细胞

根据氨基酸序列，角蛋白可分成两型：Ⅰ型（酸性）角蛋白和Ⅱ型（中性/碱性）角蛋白。重组实验发现Ⅰ型和Ⅱ型角蛋白异二聚体能形成中间丝。一个上皮细胞能含有多种角蛋白，它们共同聚合形成单一性角蛋白纤维体系。最简单的上皮像在早期胚胎和在成体肝组织内的只含一种Ⅰ型和Ⅱ型角蛋白，其他部位像舌、膀胱和汗腺上皮则含 6 种或更多角蛋白，它们的混合形式由所在的细胞内和器官内部位所决定。

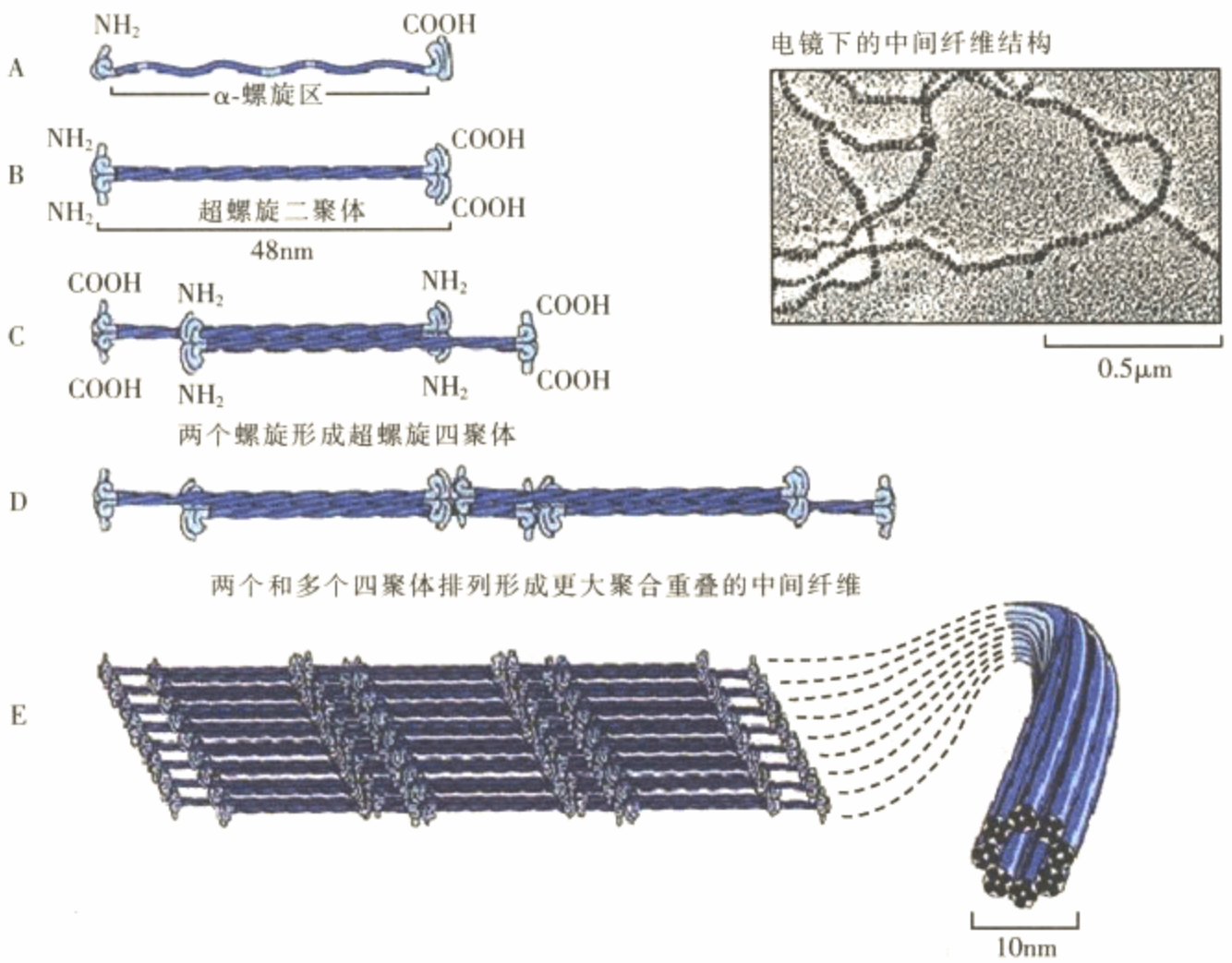
从表 7-2 可知波形蛋白、结蛋白和胶质纤维酸性蛋白都是非上皮细胞的中间纤维蛋白，其中波形蛋白最广泛分布于从间充质来源的细胞，包括成纤维细胞、内皮细胞及白细胞，还有一些细胞只在发育过程中瞬时表达。这些蛋白容易形成共聚合，但它们与角蛋白之间不形成共聚合。

细胞内中间纤维的成分经常会有变化，例如，在许多上皮来源的细胞开始只有角蛋白，而后出现波形蛋白；胶质细胞开始只有胶质细胞原纤维酸性蛋白，后来出现波形蛋白，但它们是分别排列的，说明中间纤维的种类和成分可随细胞的生长或成熟而改变。

二、中间纤维的装配和调节

与肌动蛋白和微管蛋白单体的球状分子不同，中间纤维蛋白单体分子大多数是长丝状，称丝状蛋白（fibrous protein），有氨基末端的头部、羧基末端的尾部和一个中间杆状区域。中间杆状区域由展开的 α-螺旋区组成，α-螺旋区含有纵排的重复组件，称为七位复件（heptad repeat），为具有特色的氨基酸序列。这种七位氨基酸元件，能促进两个平行的 α-螺旋杆之间形成卷曲的螺旋（coiled-coil）二聚体。在细胞骨架许多种别的长形蛋白，如 tropo 肌球蛋白和肌球蛋白分子尾部形成的超螺旋二聚体结构中也含有长短的七位复件。组装的下一步是两个超螺旋二聚体以反向平行相连，形成四聚体（tetramer）亚单位。细胞内存在少量可溶性四聚体，说明它们是中间纤维组装的基础亚单位。二聚体的反向平行排列说明四聚体以及由其形成的高级结构中间纤维都是非极化结构，也就是说在纤维两端是相同的，在沿着纤维长轴上具有对称性。这一特点使中间纤维显然不同于有极性的，而且功能依赖于极性的微管及肌动蛋白微丝。中间纤维组装的最后步骤仍不甚清楚，可能是由四聚体以简单结合反应加到伸长中的中间纤维上；结合反应沿中间纤维长轴排列，按螺旋形式包裹在一起。各种中间纤维蛋白，其分子的中间杆状区的结构是高度保守的，它们在组装中调节纤维之间侧位的相互作用；而中间纤维分子的球状头部与尾部结构区的大小

与氨基酸序列有较大差别，但不影响纤维的主轴结构。头部或尾部往往从纤维的表面突出，可以调节中间纤维与其他成分之间的相互作用。这一结构类型意味着中间纤维可以由广泛分子量的蛋白质（从约 10 000 到 200 000）形成。在多数情况下，细胞内几乎全部的中间纤维蛋白分子呈完全聚合态，只有很少的游离性四聚体。尽管如此，细胞仍旧能够调节其中间纤维的组装，并且决定其数量、长度和位置（图 7-15）。



●图 7-15　中间纤维的装配模型

A. 中间纤维蛋白单体　B. 超螺旋二聚体　C. 两个超螺旋二聚体交错形成四聚体

D. 两个四聚体组装在一起　E. 八个四聚体装配形成中间纤维

中间纤维装配的调控机制与其蛋白氨基末端头部结构域内特殊丝氨酸残基的磷酸化相关。目前认为，中间纤维蛋白丝氨酸和苏氨酸残基的磷酸化作用是中间纤维动态调节最常见最有效的调节方式。最显著的例子是在有丝分裂时，形成核板的蛋白亚单位磷酸化，使核板完全解体；当分裂完成时，特殊丝氨酸去磷酸化，核板再形成。胞质内的中间纤维在细胞分裂时，或对某些细胞外信号进行应答时，也可以进行彻底的重组装。虽然上述改变一般是由亚单位磷酸化的增强，其他因素也可能起到辅助调节作用。

三、中间纤维的功能

中间纤维在胞质中形成精细发达的纤维网络，外与细胞膜及细胞外基质相连，中间与微管、微丝和细胞器相连，内与细胞核内的核纤层相连，因此，中间纤维也具有多种功能，而且中间纤维发挥功能具有时空特异性。

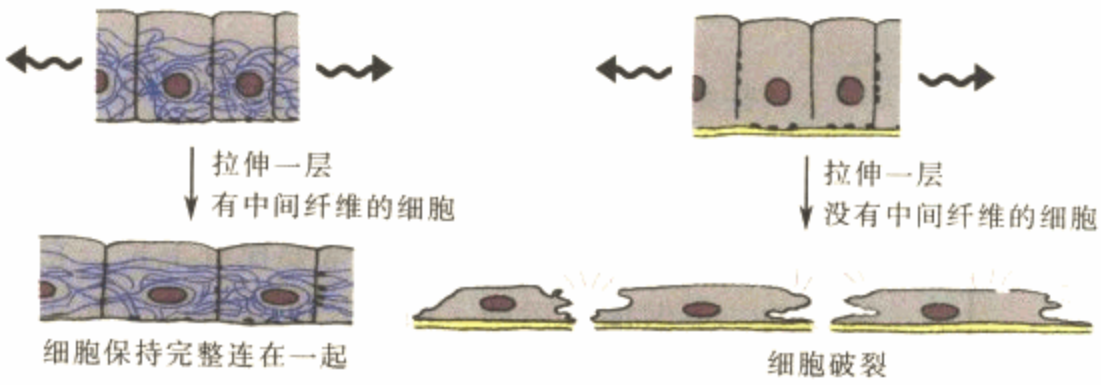
（一）中间纤维在细胞内形成一个完整的网状骨架系统

中间纤维外与质膜和细胞外基质有直接的联系，内与核膜、核基质联系，贯穿整个细胞起着广泛的骨架功能。该骨架具有一定的可塑性，对维持细胞质的整体结构和功能的完

整性有重要作用。因此中间纤维在细胞内外起着多方面结构的构成与功能联系的作用，特别与细胞核的定位和固定有关。

（二）中间纤维为细胞提供机械强度支持

中间纤维在那些容易受到机械应力的细胞的胞质中特别丰富。体外实验证实，中间纤维比微管和微丝更耐受剪切力，在受到较大的剪切力时产生机械应力而不易断裂，在维持细胞机械强度方面有重要作用（图 7-16）。



●图 7-16　中间纤维增强细胞的强度

（三）中间纤维参与细胞连接

一些器官和皮肤的表皮细胞是通过桥粒和半桥粒连接在一起的。桥粒介导细胞-细胞的黏着，半桥粒介导细胞与细胞外基质的黏着。中间纤维参与黏着连接中的桥粒连接和半桥粒连接，在这些连接中，中间纤维在细胞中形成一个网络，既能维持细胞形态，又能提供支持力。

（四）中间纤维参与细胞内信息传递及物质运输

由于中间纤维外连质膜和胞外基质，内穿到达核骨架，因此形成一个跨膜的信息通道。中间纤维蛋白在体外与单链 DNA 有高度亲和性，中间纤维有明显地在核外周聚集的特点，可能与 DNA 的复制和转录有关。此外，近年来研究发现中间纤维与 mRNA 的运输有关，胞质 mRNA 锚定于中间纤维，可能对其在细胞内的定位及是否翻译起重要作用。

（五）中间纤维维持细胞核膜稳定

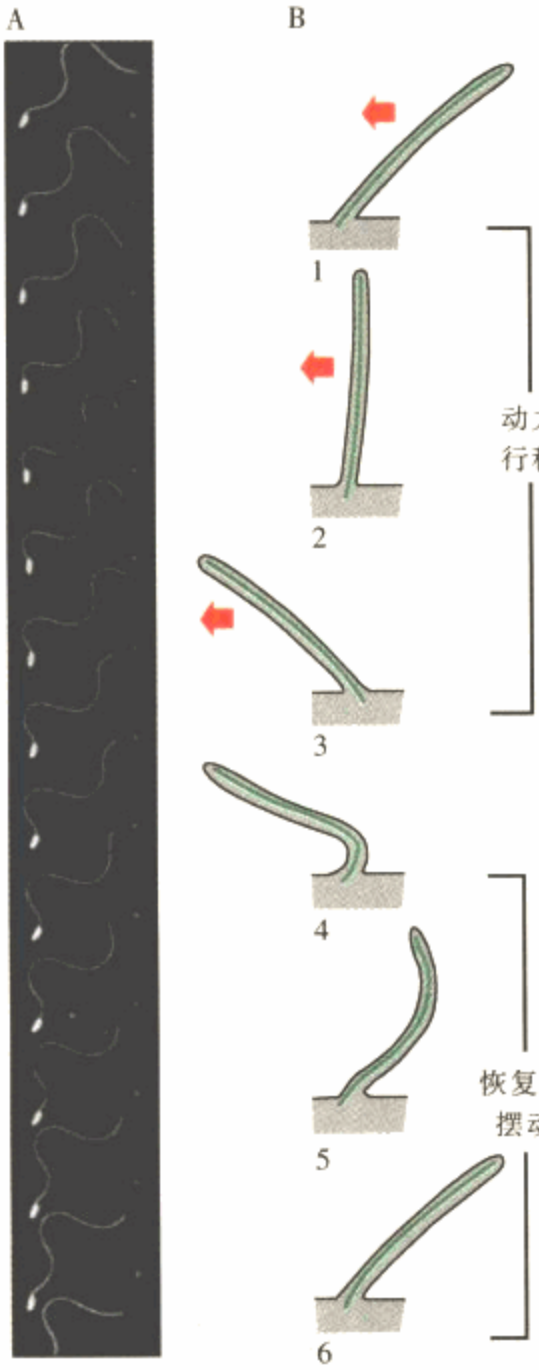
在细胞核内膜的下面有一层由核纤层蛋白组成的网络，对于细胞核形态的维持具有重要作用，而核纤层蛋白是中间纤维的一种。组成这种网络结构的核纤层蛋白 A 和 C，它们交连在一起，然后通过核纤层蛋白 B 附着到内核膜上，在内核膜上有核纤层蛋白 B 的受体。此外，中间纤维在胞质溶胶中也组成网络结构，分布在整个细胞中，维持细胞的形态。

（六）中间纤维参与细胞分化

微丝和微管在各种细胞中都是相同的，而中间纤维蛋白的表达则具有组织特异性，表明中间纤维与细胞分化可能具有密切的关系。这方面研究主要是在胚胎发育和上皮分化的方面，对其详细了解还有待于进一步研究。

第四节　细胞的运动

单个细胞的移动方式有多种，极少数细胞通过纤毛和鞭毛进行运动，如纤毛虫借助纤毛进行移动和摄取食物，精子依靠鞭毛的摆动在水中游动。但绝大多数动物细胞是通过爬行的方式在细胞外基质或固体表面上运动。例如，在胚胎发育过程中，动物体结构的形成是由胚胎细胞向特定靶部位的迁移和上皮层细胞的协同运动来共同完成，最典型的例子是神经嵴细胞在整个胚胎发育过程中从神经管长距离迁移到各部位，形成不同类型的细胞；



●图 7-17　纤毛和鞭毛的运动

（引自 Alberts B, 2002）

A. 一根纤毛的拍打运动

B. 海鞘精子鞭毛反复的波浪形运动

巨噬细胞和白细胞从血液循环中运动到炎症部位，吞噬并消灭微生物；同样成纤维细胞在结缔组织中的迁移有助于创伤组织的修复和重塑；在许多肿瘤细胞中，癌细胞的运动会导致原发肿瘤向周围组织的侵袭及通过血管或淋巴管引起机体其他部位的转移。

一、微管与细胞运动

一些细胞通过纤毛和鞭毛进行运动，如精子靠鞭毛的摆动进行游动，动物呼吸管道上皮细胞靠纤毛的规律摆动向气管外转运痰液。每根纤毛都以一种猛烈抽打的方式来运动，就像我们游蝶泳时那样（图 7-17A）。鞭毛通常要比纤毛长，它是用来推动整个细胞的，不做抽打运动，沿着长度方向传播规律性的波动，类似正弦曲线传播运动波，从而推动细胞在液体中穿行（图 7-17B）。

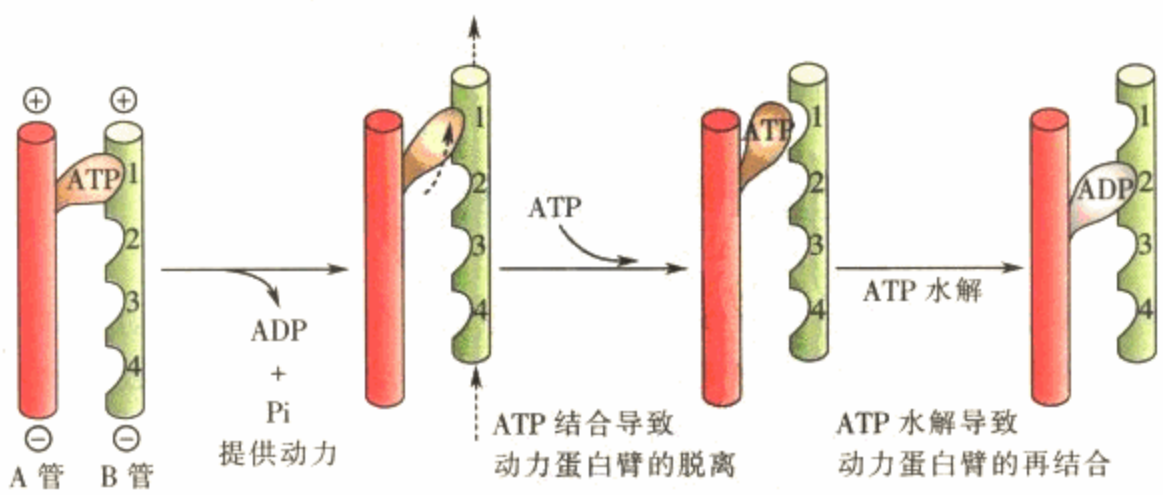
纤毛和鞭毛的运动是一种简单的弯曲运动，其运动机制一般用微管滑动模型解释：①动力蛋白头部与相邻微管的 B 微管接触，促进同动力蛋白结合的 ATP 水解，并释放 ADP 和 Pi，改变了 A 微管动力蛋白头部的构象，促进头部朝向相邻二联管的正极滑动，使相邻二联管之间产生弯曲力。②新的 ATP 结合，促使动力蛋白头部与相邻 B 管脱离。③ATP 水解，其放出的能量使动力蛋白头部的角度复原。④带有水解产物的动力蛋白头部与相邻二联管上的另一个位点结合，开始下一个循环（图 7-18）。

二、微丝与细胞运动

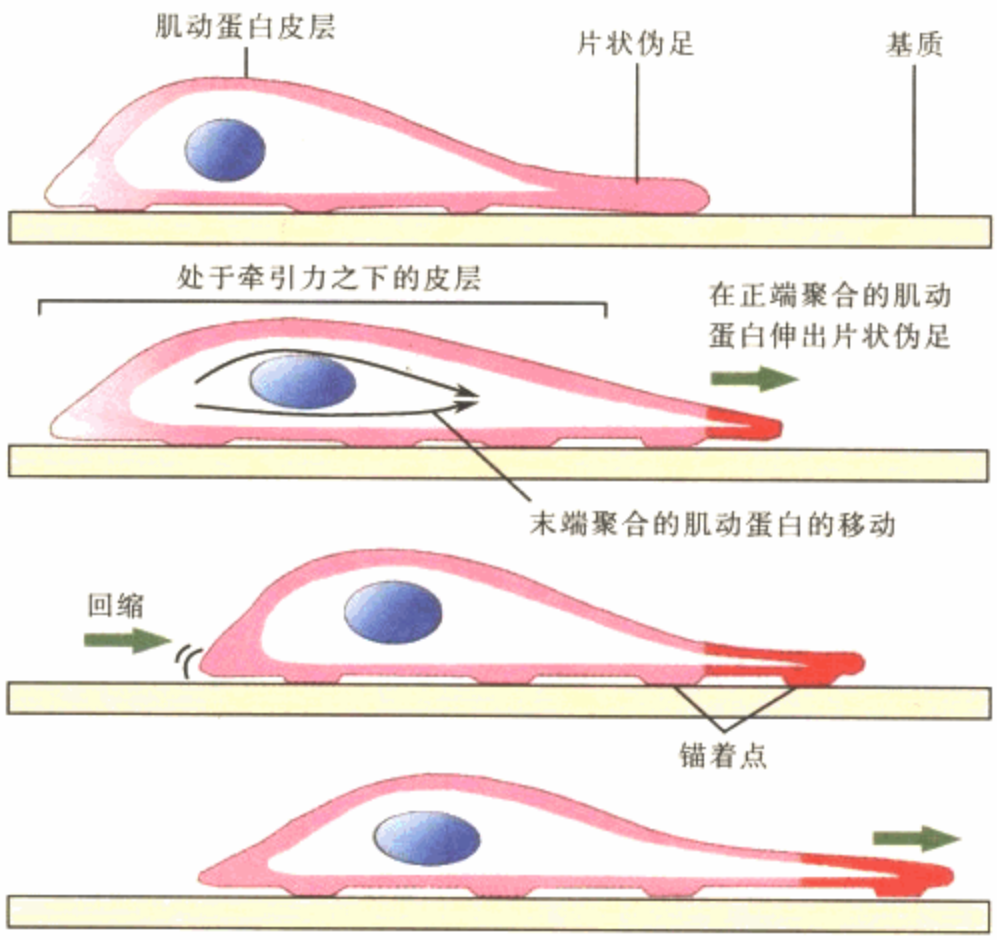
细胞运动是一个高度协同的复杂过程：细胞主要依赖于肌动蛋白和微丝结合蛋白的相互作用进行移动。这种运动可以分为三个过程（图 7-19）：①细胞在它的前端或前沿伸出突起，也叫伪足；②这些突起附着在其爬行的表面上；③细胞的其余部分通过锚着点上的牵引力将自己向前拉。

所有这三个过程都涉及到肌动蛋白丝，但是其方式不同。

第一步，通过肌动蛋白聚合使细胞表面形成突起。成纤维细胞在爬行过程中，其



●图 7-18　纤毛和鞭毛动力微管的滑动模型



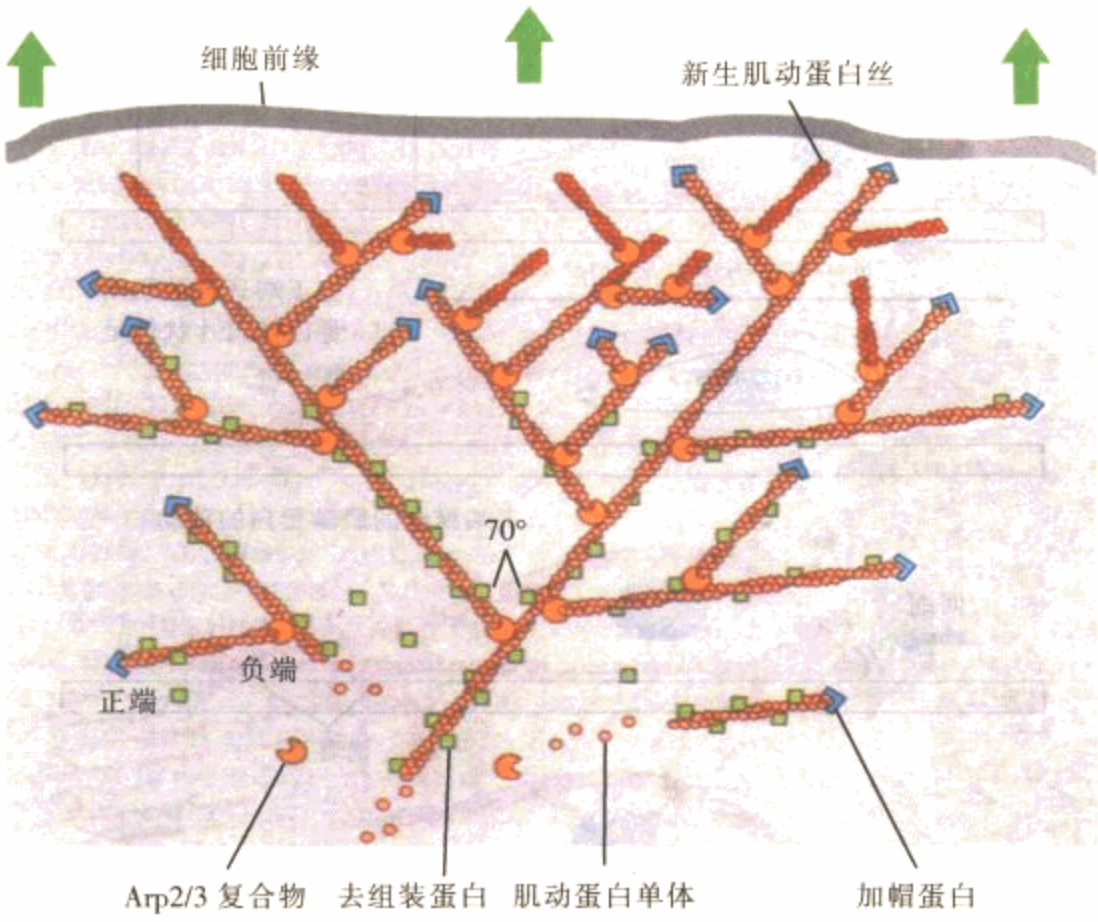
●图 7-19　培养的动物细胞爬行过程模式图

前缘规律性地伸出薄薄的片状伪足，片状伪足中含有致密的肌动蛋白丝网络，大部分纤维的正端接近细胞质膜。很多细胞也会伸出纤细而坚挺的突起，称为丝状伪足，它们不仅分布在细胞的前缘，而且也分布在细胞表面的其他部分。丝状伪足宽 0.1μm，长 5~10μm，由10~20 根松散的肌动蛋白丝纤维束组成，同样正端朝向质膜。发育中神经细胞的生长锥甚至可以长出 50μm 长的丝状伪足，它可以帮助细胞探索周围环境，发现到达目标的正确途径。丝状伪足和片状伪足都是试探性的可移动结构，其形成和回缩的速度都极快。肌动蛋白丝在质膜下聚合生长驱使细胞质膜向外突出，形成丝状伪足或片状伪足。

肌动蛋白丝在细胞前缘的形成和生长是由微丝结合蛋白所介导的，它有助于肌动蛋白在质膜下成核。一组称为 ARP2/3 （actin-related proteins2/3） 复合物的微丝结合蛋白促进分枝状肌动蛋白丝的形成。ARP2/3 复合物在生长的肌动蛋白纤维的负端形成一个核心，肌动蛋白纤维由此向正端快速生长。这些蛋白形成一个复合体并以 70°角结合在原有的肌动蛋白纤维上，促进成核并形成新的肌动蛋白纤维，这样就可使单独的纤维形成树枝状的网络。在其他微丝结合蛋白的帮助下，这个网络在前端聚合，在后端解聚，推动片状伪足向前移动（图 7-20）。

第二步，当片状伪足或丝状伪足接触到适当的表面时，它们就黏附在上面，这时称为整联蛋白（integrin） 的跨膜蛋白就与胞外基质中的分子或与另一细胞表面上的分子结合，这个运动着的细胞就在基质或另一个细胞上面爬行。同时，在爬行细胞膜的内表面整合蛋白紧紧抓住肌动蛋白丝，从而为爬行细胞内部的肌动蛋白丝系统提供了一个牢固的锚着点。

第三步，细胞通过内部的收缩产生拉力，利用锚着点将胞体向前拉动。该过程依赖于肌动蛋白与肌球蛋白的相互作用。但目前尚不清楚这种拉力是如何产生的，是通过收缩胞质中的肌动蛋白丝束呢？还是通过收缩细胞皮层中的肌动蛋白丝网，或是两者兼而有之呢？有待于进一步研究。



●图 7-20　微丝装配的成核作用及微丝网络的形成

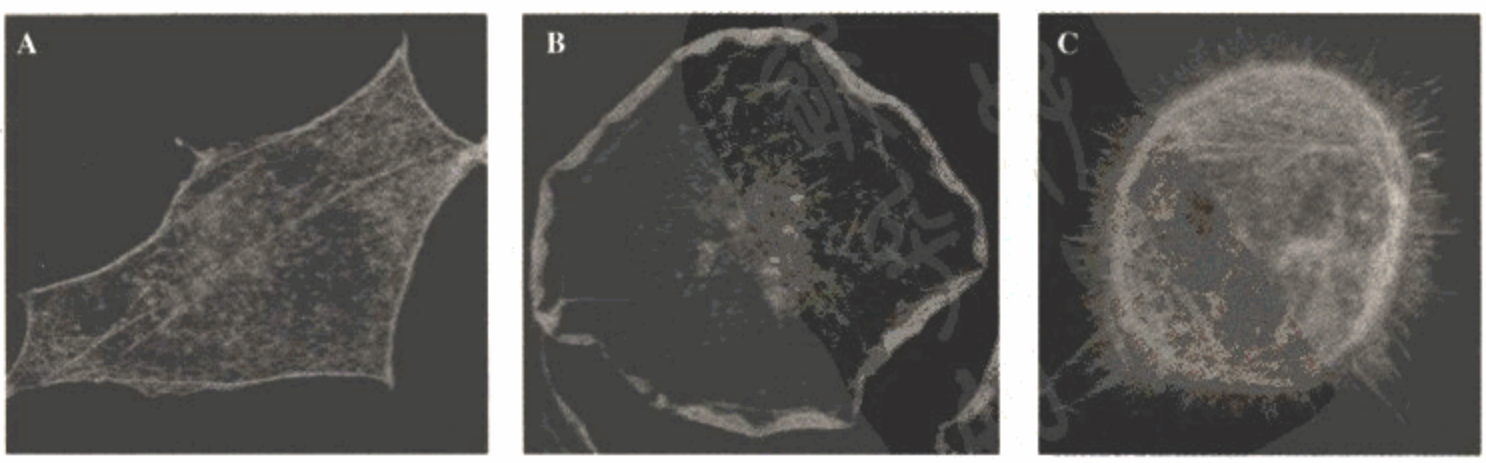
三、细胞运动的调节机制

（一）细胞外信号可以引起细胞骨架的重排

细胞外信号可以调节微丝结合蛋白的活性，使细胞可以通过细胞骨架的重排对外界环境作出应答。许多镶嵌在质膜中的受体蛋白的活化可以引发细胞骨架的重排。所有这些信号均由一类称为 RhoGTP 酶的家族所介导。该家族的成员主要是：Cdc42、Rac 和 Rho。这类蛋白可以在活性的 GTP 结合状态和非活性的 GDP 结合状态之间不断转换，从而控制细胞骨架重排。Rho 家族不同成员的激活可通过不同方式影响肌动蛋白丝的排列方式。例如，GTP 结合蛋白 Cdc42 的活化可以导致肌动蛋白的聚合，从而形成丝状伪足；GTP 结合蛋白 Rac 的活化促进片状伪足和膜褶皱的形成（图 7-21）。

活化的 Rho 既可启动肌动蛋白纤维通过肌球蛋白纤维成束形成应力纤维，又可通过蛋白质的结合形成点状接触。

这些复杂结构的显著变化是由于这些 RhoGTP 酶分子与不同的靶蛋白相互作用的结果，包括控制肌动蛋白结构和动力学的蛋白激酶及其辅助蛋白。例如，Cdc42 的活化能够



●图 7-21　GTP 结合蛋白的活化对成纤维细胞肌动蛋白丝的组装具有重要作用（引自 Alberts B, 2002）

A. 静止期细胞　B. Rac 活化细胞　C. Cdc42 活化细胞

增强ARP复合体对肌动蛋白的成核作用。Rac也具有这种作用。此外，Rac还可促进肌动蛋白丝正端的脱帽行为。这种脱帽作用为肌动蛋白在质膜的组装提供了额外位点，促进大的片状伪足的形成。

（二）细胞外信号可以指导细胞运动的方向

细胞运动需要在特定方向上进行极化。组织中有导向的细胞分裂以及连续、有组织性的多细胞结构的形成都需要对细胞极化过程进行精密调控。来自对酵母、果蝇和蠕虫，以及脊椎动物的研究表明，细胞骨架在细胞极化的过程中具有主导作用，触发极化的许多分子在进化上是保守的。

物理性或化学性的外界环境改变能够引起细胞的极化并产生运动。趋化（chemotaxis）是指在可扩散化学因子的调控下，细胞向某个方向的运动。研究最多的例子是中性粒细胞向细菌感染部位的趋化运动。中性粒细胞表面的受体蛋白可以监测到来源于细菌蛋白的浓度极低的N-甲酰化肽（只有原核细胞从甲酰甲硫氨酸开始进行蛋白合成）。这些受体甚至可以监测出细胞两侧这些可扩散肽1%的浓度差异，从而引导中性粒细胞向细菌靶点移动。与这个比较相似的例子是阿米巴向环化的AMP移动，当受体与配体相结合时，受体附近的肌动蛋白被激活，并在局部发生聚合反应。肌动蛋白的聚合反应依赖于单体Rho家族GTP酶。在酵母中，应答细胞向着信号方向伸出突起，细胞向一侧伸出突起间接地引发了细胞中“牵引机器”的再定位，由此细胞一路“嗅”着向发出信号的部位移动。

吸附在细胞外基质或细胞表面的非扩散性化学因子也可以影响细胞移动的方向。受体被信号所激活后，除了可引起方向性的肌动蛋白聚合，还可导致细胞黏附增强。大多数动物细胞的长距离迁移，包括神经嵴细胞和神经生长索，依赖于可扩散的和非扩散性的信号因子的协同作用来决定细胞运动的方向。

第五节　细胞骨架与疾病

细胞骨架对细胞的形态改变和维持、细胞内物质运输、细胞的分裂与分化等具有重要作用，是生命活动不可缺少的细胞结构，它们的异常可引起很多疾病，包括肿瘤、一些神经系统疾病和遗传性疾病等。不同细胞骨架在细胞内的特异性分布可用于对一些疑难疾病进行诊断，也可根据细胞骨架与疾病的关系来设计药物。

一、细胞骨架与肿瘤

在恶性转化的细胞中，细胞常表现为细胞骨架结构的破坏和微管解聚。在肿瘤细胞的浸润转移过程中，某些细胞骨架成分的改变可增加癌细胞的运动能力。恶性肿瘤的主要特点是细胞形态发生改变，增殖快，有侵蚀组织及向周围及远处转移的能力，这些特征都与微管和微丝的变化有关。在体外培养的多种人癌细胞中，免疫荧光染色显示微管和微丝发生明显改变：微管数量减少，网架紊乱甚至消失；微丝应力纤维破坏和消失，肌动蛋白发生重组，形成小体，聚集分布在细胞皮层，由于其形状为小球形或不规则，被命名以“肌动蛋白小体”、“皮层小体”和“面包圈”、“玫瑰花”小体等。这些细胞骨架成分的改变增加了癌细胞的运动能力。因此，微管和微丝可作为肿瘤化疗药物的作用靶点，如长春新碱、秋水仙素和细胞松弛素及其衍生物等作为有效的化疗药物可抑制细胞增殖，诱导细胞凋亡。另外，不同类型的中间纤维严格分布于不同类型的细胞中，而绝大多数肿瘤细胞通常继续表达其来源细胞特征性的中间纤维类型，即便在转移后，仍表达其原发肿瘤的中间纤维类型。因此可用于正确区分肿瘤细胞的类型及其来源，对

肿瘤诊断有重要作用。

二、细胞骨架蛋白与神经系统疾病

许多神经系统疾病与细胞骨架蛋白的异常表达有关，例如，在阿尔茨海默病（习惯上也称老年痴呆症，Alzheimer's diseases，AD）患者的神经元中，可见到不溶性神经纤维缠结（insoluble neurofibrillary tangles，NFT）。NFT 为纤维性结构，主要由高磷酸化状态的 tau 蛋白组成。tau 蛋白是一种微管结合蛋白，过度磷酸化的 tau 蛋白对微管的亲和力降低，从而使微管的稳定性降低。AD 患者的神经元中微管蛋白的数量并无异常，但存在微管聚集缺陷。

在肌萎缩性侧索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis，ALS）和幼稚性脊柱肌肉萎缩症（infantile spinal muscle atrophy），神经原纤维在运动神经元胞体和轴突近端的堆积是其神经元退化的早期表现，随后运动神经元丧失，导致骨骼肌失去神经支配而萎缩，造成瘫痪，最终死亡。

此外，包括亨廷顿舞蹈病（Huntington disease，HD）在内的一组多聚谷氨酰胺疾病（polyglutamine disease）的共同特点是，细胞浆内缠结含有微管蛋白和微丝聚合蛋白 Sla1。这些成分多与胞质内运输器有关，说明细胞骨架的损坏可能造成聚集物的形成，对细胞有毒性作用。

三、细胞骨架与遗传性疾病

一些遗传性疾病的患者常有细胞骨架的异常或细胞骨架蛋白基因的突变。如人类遗传性疾病单纯性大疱性表皮松解症（epidermolysis bullosa simplex），就是由于表皮细胞层表达的角蛋白基因突变而破坏了这类细胞的角蛋白中间纤维网，因此对机械性损伤非常敏感，即一点轻微的压挤便可使突变的基底细胞破坏，使患者的皮肤起疱。在人类或在小鼠中，凡带有这种突变基因的个体都变得很脆弱，以致死于机械创伤。此外，Wiskott Aldrich 综合征（Wiskott Aldrich Syndrome，WAS）是 X 连锁隐性遗传的免疫缺陷疾病，临床表现有血小板减少、湿疹、反复感染，并发不同程度的细胞免疫和体液免疫缺乏。研究表明，WAS 患者 T 淋巴细胞的细胞骨架异常，血小板和淋巴细胞变小，微绒毛数量减少，形态变小。进一步研究表明引起 WAS 的根源是微丝的异常。

小结

细胞骨架是指真核细胞质中的蛋白质纤维网架体系。通常所说的细胞骨架主要是指存在于细胞质内的微管、微丝和中间纤维，称为细胞质骨架。近年来又发现细胞核内也存在着细胞骨架，主要包括核基质、核纤层和染色体骨架等，与细胞质骨架共同称为广义的细胞骨架。

微管是由微管蛋白和微管结合蛋白组成的中空圆柱状结构，在不同类型细胞中有相似结构。微管是一种动态结构，主要存在于细胞质中，控制着膜性细胞器的定位及胞内物质运输。微管还能与其他蛋白质共同装配成纤毛、鞭毛、基体、中心体、纺锤体等结构，参与细胞形态的维持、细胞运动和细胞分裂等。

微丝是由肌动蛋白组成的细丝，它以束状、网状或散在等多种方式有序地存在于细胞质的特定空间位置上。微丝是一种动态结构，可与许多种微丝结合蛋白相结合，参与细胞

形态维持、细胞的运动、肌肉收缩和细胞质的分裂等活动。

中间纤维是三类细胞骨架纤维中结构最为复杂的一种，可分为六种类型。中间纤维在细胞内形成一个完整的网状骨架系统，为细胞提供机械强度支持。中间纤维还与细胞连接以及细胞内信息传递及物质运输、细胞分化有关。

有些细胞靠纤毛、鞭毛进行运动，是由微管间的相互滑动来实现的。一些单个细胞的运动，如细胞迁移时伪足的形成就是由微丝完成的。而在此过程中细胞骨架的重排以及细胞移动的方向受到细胞外信号精密调控，并由微管和微丝来协同完成。

细胞骨架的异常可引起很多疾病，包括肿瘤、一些神经系统疾病和遗传性疾病等。不同细胞骨架在细胞内的特异性分布可用于对一些疑难疾病的诊断，也可根据细胞骨架与疾病的关系来设计药物。

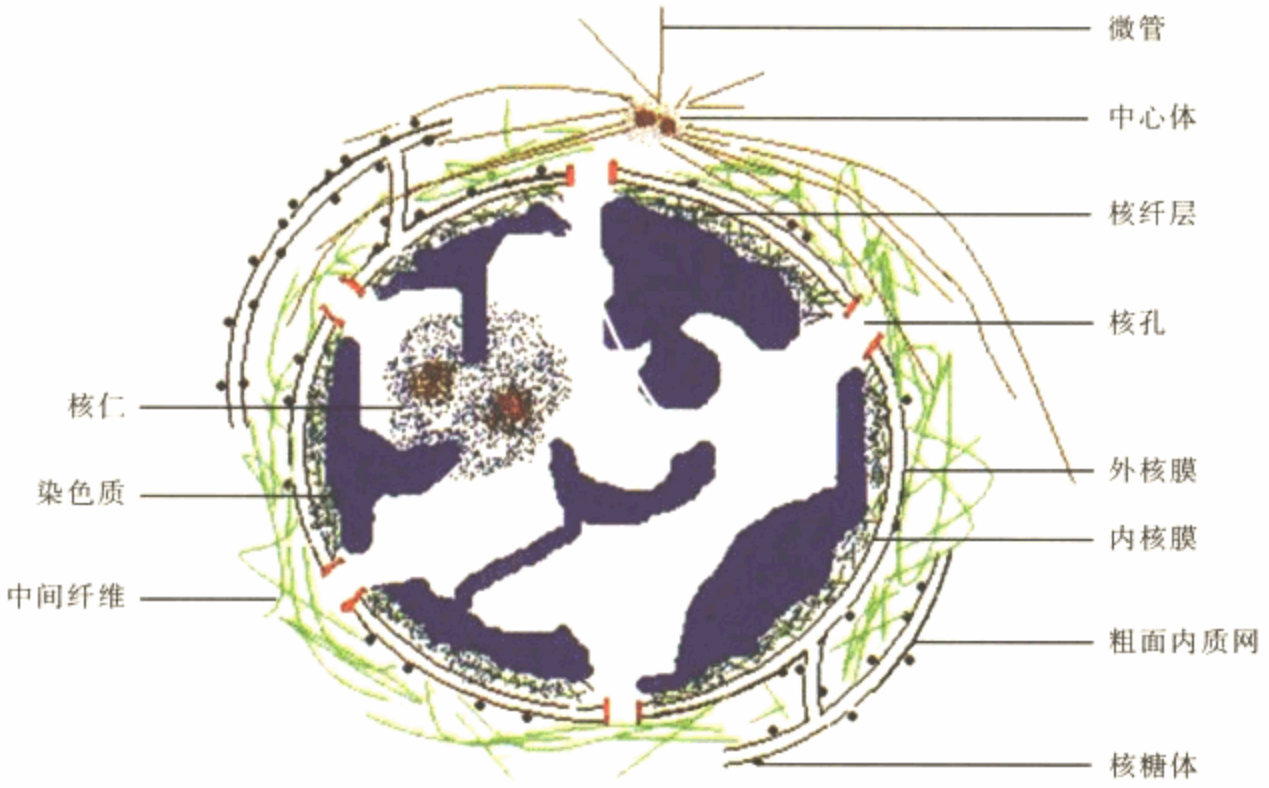
（李　丰）

第八章　细　胞　核

细胞核是真核细胞内最大的细胞器，是遗传物质储存、复制和转录的场所，是细胞生命活动的控制中心。细胞核的出现是生命进化的重要一步，也是真核生物和原核生物最大的区别。原核细胞没有核，其 DNA 等物质位于细胞质的局部，称为拟核。核的出现使核膜将遗传物质包裹在核内，使之与细胞内的其他活动分开，保证了细胞的遗传稳定性。更重要的是使真核细胞中遗传信息的转录和翻译过程在不同的时间和空间上进行，转录发生在核中，而加工翻译过程在胞质中进行，这使真核细胞 RNA 前体在进行蛋白质合成前可进行有效的剪切和修饰，为基因表达的调控提供了方便，赋予真核细胞更复杂的功能。

每个细胞通常只有一个核，但有些细胞为双核甚至多核，如人的肝细胞和骨骼肌细胞。细胞核的大小在不同生物体有所不同，生长旺盛的细胞，如卵细胞、肿瘤细胞核较大；分化成熟的细胞则核较小。高等动物细胞核的直径通常在 5~10μm。细胞核的形态各不相同，常与细胞形状、细胞类型、发育时期有关，一般为圆形或椭圆形，肌细胞核呈杆状，嗜中性细胞核呈分叶状。

细胞核的形态伴随细胞的增殖过程呈现周期性的变化，细胞分裂期，核被膜裂解，各种成分重新分配，无明显的核形态，只有在处于间期的细胞中，才能观察到细胞核的完整结构。处于间期的细胞核叫间期核，间期核的基本结构包括核被膜、核仁、染色质和核基质（图 8-1）。



● 图 8-1　间期细胞核结构的模式图

第一节　核　　膜

核膜（nuclear membrane）又称核被膜（nuclear envelope），位于间期细胞核的最外层，是细胞质与细胞核之间的界膜。它使细胞核成为细胞中一个相对独立的体系，在核内形成相对稳定的环境，使 DNA 的复制和 RNA 的翻译在空间上分隔开来；在原核细胞中，DNA 集中，但并无核膜包围，故称拟核（nucleiod）。核膜在普通光学显微镜下难以分辨，在相

差显微镜下，由于细胞质与细胞核的折光率不同，可以看核膜的界限，只有在电镜下才能看清核膜的微细结构。

一、核膜的化学组成

核膜的主要化学成分：蛋白质约占 65%~75%，脂质次之，此外，可能还有少量的 DNA 和 RNA。

（一）蛋白质

通过电泳分析可鉴别出核膜含有 20 多种蛋白质，其分子量为 16 000~160 000。包括组蛋白、基因调节蛋白、DNA 和 RNA 聚合酶、RNA 酶以及电子传递有关的酶类等。

核膜所含的酶类与内质网的极为相似。如作为内质网的标记葡萄糖-6-磷酸脱氢酶也见于核膜，与电子传递有关的酶类，如 NADH-细胞色素 C 还原酶、NADH-细胞色素 b5 还原酶，细胞色素 P450 等，均见于内质网及核膜上，说明两者在酶成分上有相似性，但其浓度有差异，如 P450 的浓度，内质网高于核膜。在核膜的内核膜中还含有核纤层蛋白（nuclear lamina protein）。

（二）脂类

核膜中所含有的脂类也和内质网相似。都含有不饱和脂肪酸卵磷脂和磷脂酰乙醇胺，此外均有胆固醇、甘油三酯等。但其含量有差别，核膜中不饱和脂肪酸和脂肪酸的含量都较低，而胆固醇和甘油三酯的含量却较高。这种结构成分的特点，说明核膜与内质网的关系密切，也说明核膜具有一定的稳定性。

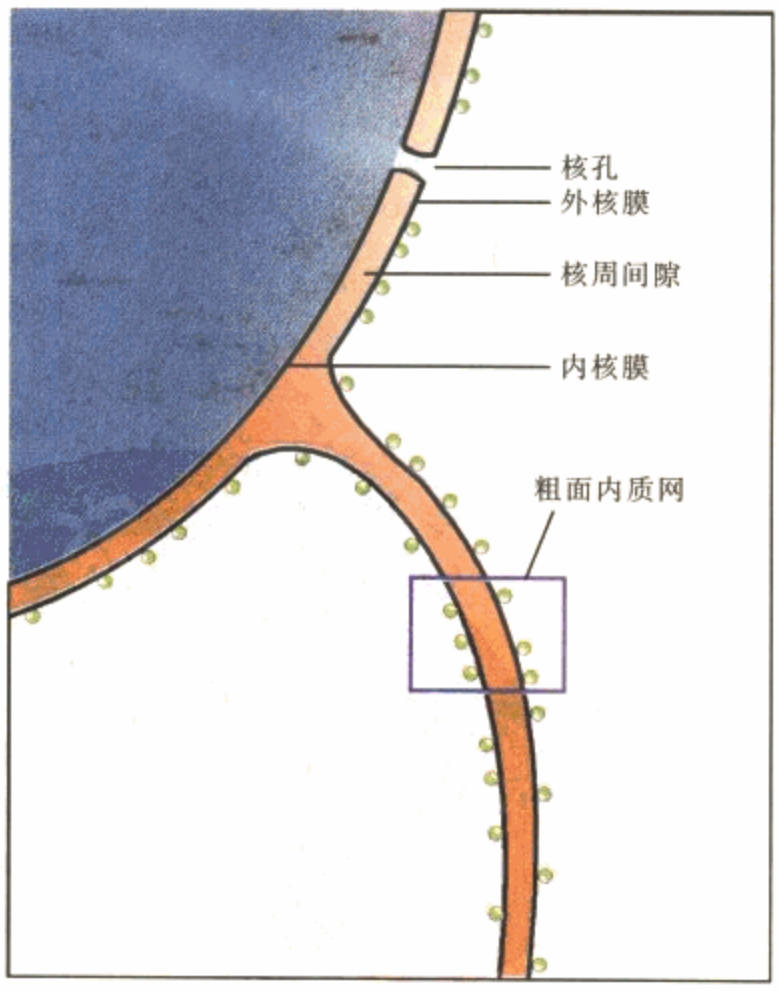
二、核膜的结构与区域化作用

（一）核膜由两层平行但不连续的非对称性单位膜构成

核膜由内外两层平行但不连续的单位膜构成（图 8-2）。面向胞质的一层称为外核膜（outer nuclear membrane），而面向核质的一层称为内核膜（inner nuclear membrane）。内、外核膜厚度相同，均为 7.5nm。两层膜之间的间隙称为核周间隙。内、外核膜常在某些部位相互融合形成环状开口称为核孔，它是细胞核与细胞质之间物质交换的通道。

1. 外核膜与粗面内质网相连续 外核膜结构与粗面内质网相似，并彼此相连，使核周间隙与内质网腔亦彼此相通，其外表面也常附着有核糖体颗粒。由于结构上的这种联系，外核膜被认为是粗面内质网的特化区域，还参与了某些蛋白质的合成。外核膜的胞质面附着有 10nm 的中间纤维（intermediate filament），此外还可见微管等细胞骨架成分，它们与细胞核的定位有关。

2. 内核膜靠向核质、表面光滑 内核膜面向核质，与外核膜平行排列，表面光滑，无核糖体颗粒附着，但其核质面与一层致密的纤维网络结构——核纤层紧紧相贴。此外，内核膜上有一些特有蛋白成分，如核纤层蛋白 B 受体（lamin B receptor），可与核纤



●图 8-2 核被膜的结构

层蛋白B 特异性结合，将核膜固定在核纤层上。

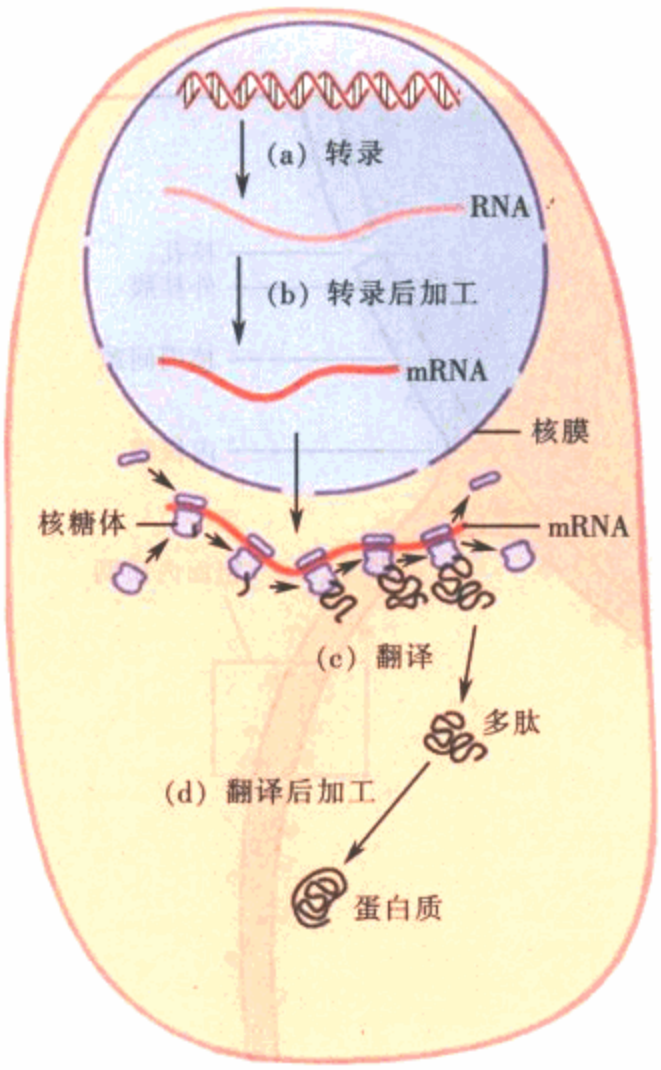
在真核细胞的细胞周期中，核膜随细胞周期的运转而进行有规律的解体与重建。在分裂间期，核膜完整；而在分裂期，核膜崩解成单层膜泡；在分裂末期，核膜又将围绕染色体重新形成，如此周而复始。

3. 内外核膜之间的核周间隙　内外两层核膜之间有宽为 20~40nm 的腔隙，即核周间隙(perinuclear space) 或核周池 (perinuclear cisternae)，它与粗面内质网有临时通道，内含多种蛋白质和酶。核周间隙的宽度随细胞种类及功能状态的不同而有所不同。

4. 内外核膜融合成的核孔　内外两层核膜融合形成的小孔，称核孔 (nuclear pore)。核孔在核膜上的密度一般为 35~65 个/μm^2。一个典型的哺乳动物细胞核核膜上分布有 3 000~4 000 个核孔。但核膜上核孔的数量、分布密度以及分布形式则因细胞类型、核功能状态的不同而存在较大差异。通常细胞核活动旺盛的细胞中核孔数目较多，反之较少。如蛙卵细胞每个核可有 37.7×10^6 个核孔，但其成熟后每个细胞核仅有 150~300 个核孔。在电镜下，核孔并非单纯由内外两层核膜融合形成的小孔，而是由蛋白质构成的复杂结构，即核孔复合体。

(二) 核膜将核质与胞质限定在各自的区域并控制着核-质间的物质交换

1. 核膜的区域化作用使转录和翻译在空间上分离　核膜是细胞核与细胞质之间的界膜。由于其特殊位置决定它至少有两方面的功能：首先就是核膜的区域化作用，使得 DNA 复制、RNA 转录与蛋白质的翻译在空间上加以分离 (图 8-3)。核膜构成了核、质间的一道天然选择性屏障，将细胞分为细胞核与细胞质两大结构区与功能区。核膜的出现在稳定细胞核的形态与成分方面发挥重要作用，使细胞核有相对稳定的内环境，保证 DNA 复制、RNA 转录与加工在核内进行，而蛋白质的合成则局限在细胞质中完成，使遗传信息的传递在不同的空间进行，避免了彼此干扰。RNA 前体在细胞核内先进行有效的剪接以去除内含子，并进行必要的修饰如 5′端带帽与 3′端加尾，只有加工成熟的 mRNA 才能进入细胞质指导蛋白质的合成，确保了真核生物基因表达的准确性与高效性。而原核细胞因无核膜分隔，其 RNA 转录与蛋白质合成均在同一空间中进行，即 RNA 分子未完成转录前，已开始与核糖体结合并指导蛋白质的合成。所以在指导蛋白质合成之前，RNA 转录产物是没有机会进行任何修饰的。



●图 8-3　核膜的区域化作用

2. 核膜控制着细胞核与细胞质间的物质交换　核-质间频繁的物质交换是细胞生命活动所必需的，其交换方式与交换物质的类型密切相关。无机离子及小分子物质如水分子、K^+、Cl^-、Ca^{2+}、Mg^{2+}、单糖、氨基酸等均可自由通过核膜；而绝大多数大分子物质及一些小分子颗粒则主要通过核孔复合体以选择性的运输方式实现核-质间的物质交换。

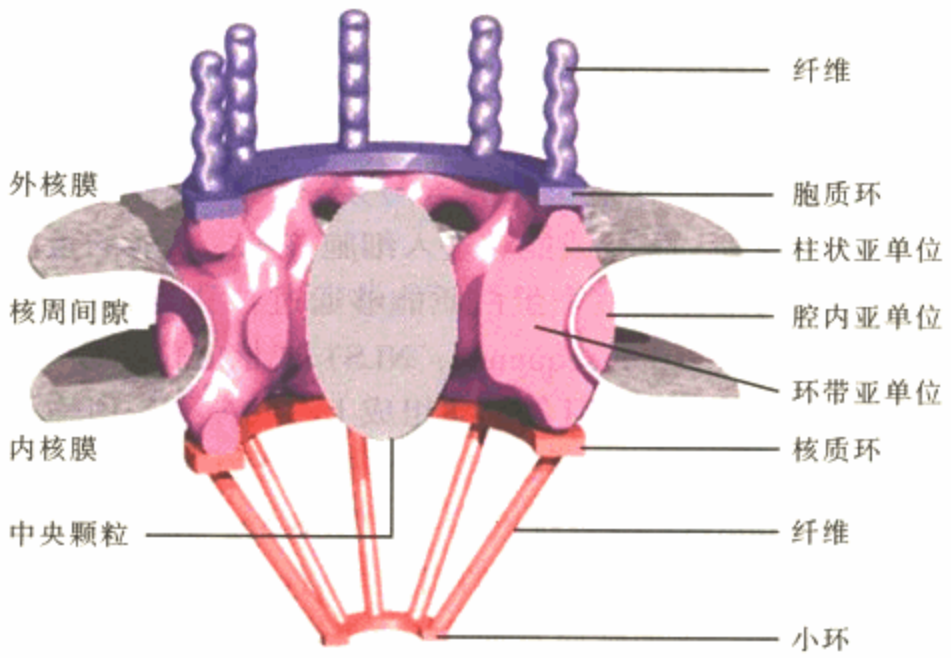
三、核孔复合体与核-质间的物质运输

1949~1950 年间，H. G. Callan 和 S. G. Tomlin 用透射电镜观察两栖类卵母细胞的核膜时发现了核孔。核孔并非单纯的小孔，而是由蛋白质构成的复杂结构，1959 年 M. L. Waston 将这种结构命名为核孔复合体。所有真核细胞的间期细胞核普遍存在核孔复合体。

(一) 核孔复合体的捕鱼笼式结构模型被普遍接受

核孔是内外核膜融合产生的圆环状结构。它并非简单的

孔洞，电镜下可见核孔上镶嵌有复杂的结构，它是由多个蛋白质颗粒以特定方式排列而成的蛋白分子复合物，称为核孔复合体（nuclear pore complex，NPC）。关于核孔复合体的结构一直是一个令人感兴趣的问题，不断有新的结构模型提出，目前比较普遍被接受的结构模型为捕鱼笼式（fish-trap）核孔复合体模型（图 8-4），即核孔复合体主要由四种组分构成：①胞质环（cytoplasmic ring）：位于核孔边缘的胞质面，与外核膜相连，环上连有 8 条细长纤维对称分布伸向胞质；②核质环（nuclear ring）：位于核孔边缘的核质面，与内核膜相连，环上也有 8 条纤维伸向核质，这些纤维末端形成一个由 8 个颗粒组成的小环，构成捕鱼笼样结构，称为“核篮”（nuclear cage）；③辐（spoke）：是由核孔边缘伸向核孔中心的结构，呈辐射状八重对称分布，主要由 3 部分构成：一是位于核孔边缘，连接胞质环与核质环的“柱状亚单位”（column subunit），起到支撑核孔的作用；二是穿过核膜伸入核周间隙的“腔内亚单位”（luminal subunit）；三是在柱状亚单位内侧靠近核孔中央的“环带亚单位”（annular subunit），是核-质交换的通道；④中央栓（central plug）：又称为中央颗粒（central granule），位于核孔中央，呈棒状或颗粒状，推测它可能参与核-质交换。由于中央颗粒并非存在于所有的核孔复合体中，有人认为它不是核孔复合体的固有组分，而是正在通过核孔复合体的被转运物质。由此可见，核孔复合体的胞质面与核质面两侧的结构是不对称的，这与其在功能上的不对称是相适应的。



●图 8-4　核孔复合体结构模型

核孔复合体是一个多蛋白复合体，由约 30 个不同的核孔蛋白（nucleoporin，Nup）组成。这些核孔蛋白在进化上高度保守，多含有一簇由苯丙氨酸（Phe，F）和甘氨酸（Gly，G）组成的 FG 重复序列，该序列可与核转运受体——入核素（importin）β 或其同系物相互作用，并提供核转运受体-亲核蛋白复合体的结合位点，从而介导亲核蛋白通过核孔复合体进入细胞核内。大多数核孔蛋白同时位于核孔复合体中央通道的胞质面或核质面，少部分蛋白不对称地分布于中央通道的两侧。在脊椎动物中，Nup358 是核孔复合体胞质面纤维丝的主要组分，Nup214 也是核孔复合体胞质面的组分之一，Nup358、Nup214 及其他不对称分布的核孔蛋白在核转运受体-亲核蛋白复合体的组装和解离过程中起重要作用。

（二）核孔复合体介导细胞核与细胞质间的物质交换

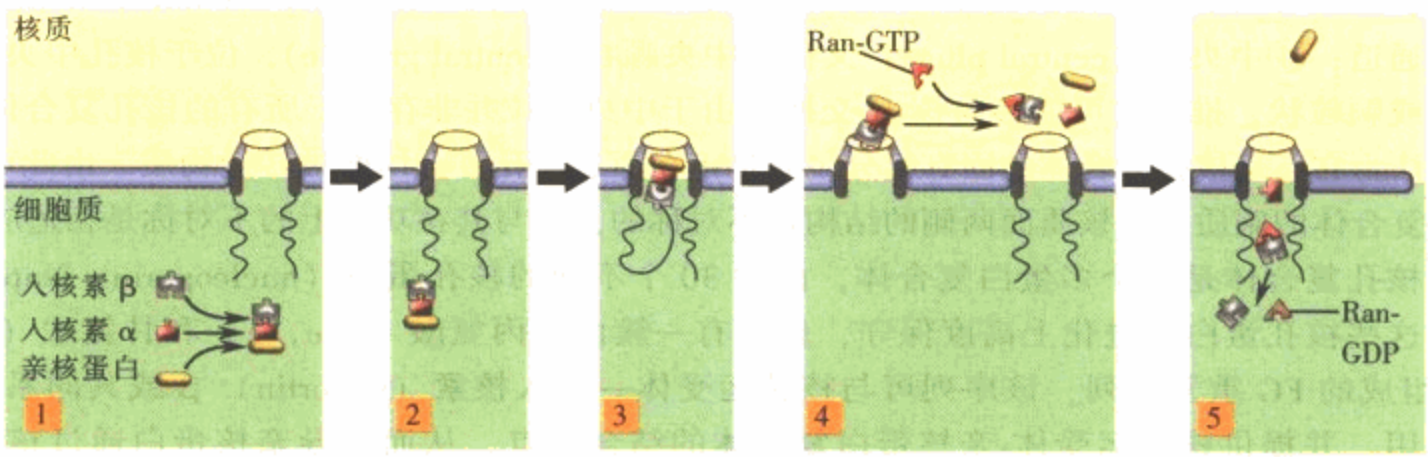
1. 核孔复合体可通过主动运输和被动运输方式实现核-质间的物质转运　核孔复合体是细胞核与细胞质之间物质交换的双向选择性亲水通道，是一种特殊的跨膜转运蛋白复合体。核孔复合体的双向性表现在它既能介导蛋白质的入核转运，又能介导 RNA、核糖体蛋白颗粒的出核转运。

核孔复合体可通过主动运输和被动运输两种方式实现核-质间的物质转运，其转运方式取决于被转运物质的大小及性质。一般来说，核孔复合体的有效直径为 9~10nm，故离子、小分子及直径小于 10nm 的物质原则上都可以自由通过。但它对 Na^+ 等少数离子仍有一定的屏障作用，某些小分子也可能因与其他大分子结合而不能自由通过。

主动运输是核孔复合体最重要的功能之一。生物大分子的核-质分配主要借助核孔复合体的主动运输方式来实现。如细胞核内 DNA 复制及 RNA 转录所必需的各种酶类均需先在胞质中合成后再转运至胞核；而胞质中蛋白合成所需的 tRNA、mRNA 等均需先在胞核

中合成，再运至胞质参与蛋白质合成的相应环节。该主动运输方式是一个信号识别与载体介导的耗能过程，具有饱和性。核孔复合体介导主动运输的功能直径要比被动运输大，甚至可达 26nm，但它对运输颗粒的大小仍有限制。

2. 核定位信号介导亲核蛋白入核　亲核蛋白（karyophilic protein）是一类在细胞质中合成，需要或能够进入细胞核发挥功能的蛋白质。通常它们含有 4~8 个氨基酸组成的特殊序列来保证整个蛋白质能够通过核孔复合体被转运到核内，该序列称为核定位序列（nuclear localization sequence，NLS）或核定位信号（nuclear localization signal，NLS）。不同亲核蛋白的入核信号其氨基酸组成上存在差异，但均富含 Arg、Lys 及 Pro 等碱性氨基酸。亲核蛋白的入核主动运输过程除需其自身的 NLS 外，还需核转运受体（nuclear transport receptor）及 RanGTP 酶系统的参与（图 8-5）。核转运受体包括分布于胞质中的入核素与转运素（transportin）及胞核中的出核素（exportin），它们既可与核孔复合体结合，又可与被转运物质结合。在细胞质基质中，亲核蛋白首先与入核素 α 结合，后者与入核素 β 结合形成NLS-入核素 α/β 复合体，入核素 β 通过与核孔复合体伸向胞质的核孔蛋白 FG 重复序列结合，将 NLS-入核素 α/β 复合体定位于核孔复合体的胞质侧纤维，通过与 FG 重复序列的反复结合与分离，NLS-入核素 α/β 复合体经核孔转运入核。该复合体在通过核孔复合体时，RanGTP 酶水解 GTP，为核转运提供能量；同时激活入核素 β，释放入核素 α 和 NLS，继而亲核蛋白沿核内骨架被运至核内。核内入核素 β 与 RanGTP 酶结合成二聚体被运回胞质后解离，入核素 α 也通过较为复杂的出核转运过程，回到胞质。它们均可参与下一轮亲核蛋白的入核转运。



●图 8-5　亲核蛋白输入细胞核的过程

RNA 与核糖体蛋白颗粒等大分子物质经核孔的出核转运与亲核蛋白的入核转运过程相似，也需要出核转运信号及核转运受体如出核素的参与。有迹象表明入核转运与出核转运间存在某种联系，它们可能需要一些共同因子的参与。

经典实验：核定位信号的发现

背景知识

细胞核作为一个独特的生化区域，需要一种蛋白分配机制来确保核-质间蛋白质的正确分布，借以维持细胞核的生化特性。20 世纪 70 年代的研究表明小分子物质可以通过扩散方式迅速通过核膜，而大多数蛋白质则不能。这提示核蛋白很可能被特异性识别，并被选择性地从胞质中核糖体上的合成部位转运入核。早前 Günter Blobel 等已发现了由一小段氨基酸组成的信号序列可引导蛋白质定位于内质网。那么，核蛋白是否存在类似的信号序列来引导其入核转运呢？1984 年，Alan Smith 及其同事对这一问题进行了深入探讨，发现了核定位信号的存在。

实验内容

他们选用病毒 SV40 的 T 抗原作为研究动物细胞核定位的蛋白模型。T 抗原常分布于被 SV40 感染的宿主细胞核内。研究发现在啮齿类动物及猴子的细胞内，T 抗原的 Lys-128无论是突变为 Thr 还是 Asn，均可阻止 T 抗原在核内聚集，表明 Lys-128 应是核定位信号的一部分。Alan Smith 及其同事用两种方法验证了这一假说。

首先探讨了去除 T 抗原的不同区域对其在亚细胞层次上定位的影响。发现去除 T 抗原的第 1~126 位氨基酸或第 136~C 末端的氨基酸后，它依旧聚集于细胞核；相反，去除第127~132 位氨基酸后，T 抗原则滞留于胞质中。因此，127~132 位氨基酸序列是 T 抗原核定位所必需的。

此外，将 T 抗原的第 127~132 位氨基酸序列与胞质蛋白半乳糖苷酶融合或丙酮酸酯酶融合，均可引起这些胞质蛋白在核内聚集。因此，T 抗原的该段氨基酸序列既是引导蛋白核定位的必要条件，也是充分条件。

发表论文

Daniel Kalderon, Bruce L. Roberts, William D. Richardson and Alan E. Smith (National Institute for Medical Research, Mill Hill, London, UK):

A short amino acid sequence able to specify nuclear location. Cell, 1984, 39 : 499-509

后续影响

SV40 T 抗原的核定位信号为其他核蛋白相似序列的研究提供了基础。该信号可引导蛋白质的入核转运，确保了细胞核特有的生化特征，使细胞核与细胞质之间从根本上实现了区域化分隔。此外，核定位信号的发现对核蛋白入核转运机制的研究亦起着至关重要的作用。

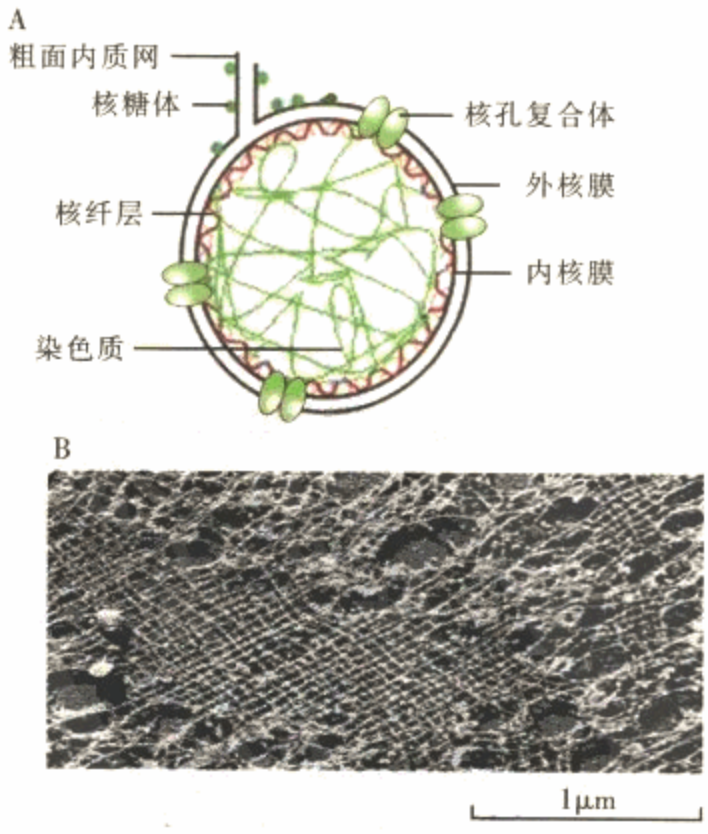
四、核纤层的结构与功能

(一) 核纤层是一层紧贴内核膜的纤维蛋白网

核纤层 (nuclear lamina) 是附着于内核膜下的纤维蛋白网。它与中间纤维及核骨架相互连接，形成贯穿于细胞核与细胞质的骨架体系。

核纤层位于内核膜与染色质之间，厚 10~100nm，纵横排列整齐，整体观呈球形或笼形网络，切面观呈片层结构 (图 8-6)。核纤层在高等真核细胞间期细胞核中普遍存在，而分裂期细胞的核纤层解体并以蛋白单体形式存在于细胞质中。

组成核纤层的纤维蛋白称为核纤层蛋白 (lamin) 或 lamina 多肽。蛋白质化学与免疫化学分析证实，多种动物的核纤层蛋白同属于一个蛋白家族。哺乳动物和鸟类细胞的核纤层由核纤层蛋白 A、B、C 三种蛋白构成，其相对分子量为 60~70kD。研究证明核纤层蛋白 A 与核纤层蛋白 C 是同一编码基因的不同加工产物。因此，核纤层蛋白分为两类：A 型核纤层蛋白 (包含核纤层蛋白 A 和 C)；B 型核纤层蛋白 (核纤层蛋白 B)。然而并非所有细胞中均同时存在这两类核纤层蛋白，它们在细胞分化过程中的表达具有细胞特异性，A 型核纤层蛋白仅见于分化的细胞中，而 B 型核纤层蛋白则存在于所有体细胞中。



●图 8-6 核纤层的分布与超微结构

A. 核纤层分布示意图 B. 核纤层的超微结构

通过比较核纤层蛋白氨基酸序列发现，它们与中间纤维有较高的同源性，其同源性甚至超过不同中间纤维间的同源程度。因此认为核纤层蛋白属于中间纤维家族成员，是一种中间纤维。可以说核纤层是由中间纤维构成的一个纤维状网架结构，它在细胞分裂过程中，也在不断的发生解聚与重组。

（二）核纤层是细胞核中起支架作用的多功能网架结构

鉴于核纤层与核膜、染色质及核孔复合体在结构上的密切联系，推测核纤层不仅为核膜及染色质提供结构支架，还参与了 DNA 的复制、RNA 的成熟与转运，以及核膜崩解与重建。

1. 核纤层在细胞核中起支架作用　用高盐溶液、非离子去污剂和核酸酶去除大部分核物质，只有核孔复合体与核纤层存留，但仍能维持核的轮廓。此外，核纤层与核骨架及穿过核膜的中间纤维相连，使胞质骨架和核骨架形成一连续网络结构。

2. 核纤层与核膜重建及染色质凝集关系密切　生化分析表明，三种核纤层蛋白均有亲膜结合作用，内核膜上存在核纤层蛋白 B 受体，介导核纤层与核膜的结合。核纤层在细胞分裂时呈现出周期性的变化，在分裂前期结束时，核纤层被磷酸化而解聚，核膜崩解为核膜小泡，其中 B 型核纤层蛋白与核膜小泡结合，A 型则溶于胞质中；在分裂末期，核纤层蛋白去磷酸化重新组装，介导核膜的重建。采用点突变方法改变核纤层蛋白的磷酸化位点可干扰核纤层解聚及核膜崩解。由此可见，核纤层与核膜的周期性变化密切相关。在间期核中，核纤层还提供了染色质（异染色质）锚定的位点，使染色质结合于核纤层内侧，再进一步螺旋化形成染色体。

3. 核纤层参与了细胞核构建与 DNA 复制　体外细胞核装配系统为探讨该问题提供了良好的实验模型。研究发现，从来源于 CHO 分裂细胞的非细胞体系中选择性去除 A 型核纤层蛋白或 B 型核纤层蛋白，将广泛抑制核膜与核孔复合体围绕染色体的装配，说明核纤层对间期细胞核的组装具有极为重要的作用。研究表明，缺乏核纤层的细胞核不能进行 DNA 复制，从一个侧面反映了核纤层在 DNA 复制中的作用。

第二节　染色质与染色体

1879 年，W. Flemming 提出了染色质这一术语来描述核内强嗜碱性物质；1888 年，W. Waldeyer 提出了染色体的命名。染色质与染色体是遗传物质在细胞周期不同阶段的不同存在形式。染色质（chromatin）是间期细胞遗传物质的存在形式，由 DNA、组蛋白、非组蛋白及少量 RNA 等构成的细丝状复合结构，形态不规则，弥散分布于细胞核内。染色体（chromosome）是指细胞在有丝分裂或减数分裂过程中，染色质经复制后反复缠绕凝聚而成的条状或棒状结构，借以保证 DNA 被准确地分配到子代细胞中，对物种遗传性状稳定性的维持起重要作用。

一、染色质的组成成分

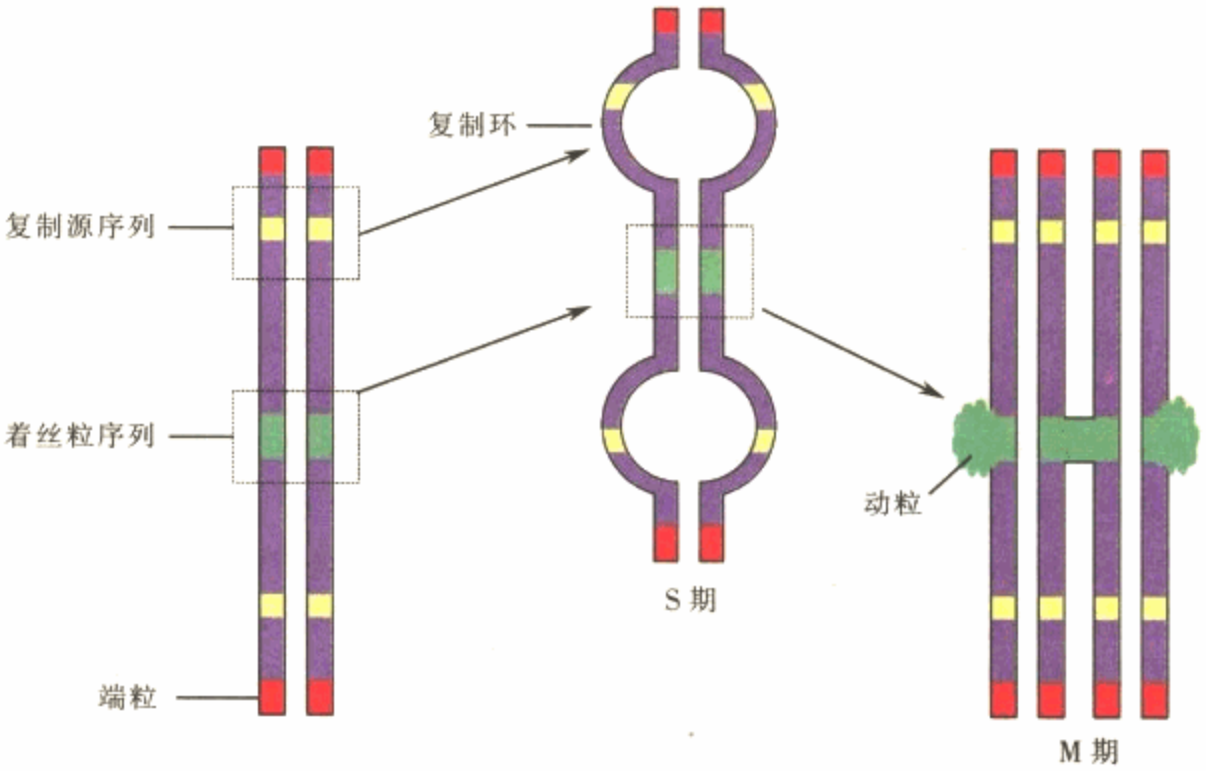
分离染色质进行生化分析表明：DNA 与组蛋白是染色质的稳定成分，二者总量占染色质化学组分的 98%以上，其中 DNA 与组蛋白的含量接近 1∶1。RNA 与非组蛋白也是染色质的构成成分，但其含量较少，且随细胞生理状态的不同而改变。

（一）染色质中的 DNA 是遗传信息的载体

除少数病毒之外，所有生物的遗传物质均为 DNA。DNA 是由胞嘧啶（C）、胸腺嘧啶（T）、腺嘌呤（A）及鸟嘌呤（G）四种核苷酸以磷酸二酯键连接而成的生物大分子，DNA 分子呈双螺旋结构，其两条链的核苷酸序列按碱基互补配对原则排列，即 A 对 T，G 对 C。真核细胞中每条未复制的染色体均含有一条线型 DNA 分子。一个真核细胞单倍染色体

组中所含的全部遗传信息称为一个基因组（genome）。一般来说，同一物种的体细胞之间DNA分子结构与含量相同，但不同物种间则差异很大。

一条功能性的染色质DNA分子必须能进行自我复制，得到两个完全相同的DNA分子，并将其平均分配到子细胞中，保证遗传信息的稳定传代。这就要求染色质DNA必须包含三类不同的功能序列（图8-7）：端粒序列、着丝点序列及复制源序列。①端粒（telomere）序列：它广泛存在于真核生物染色体的末端，是一个富含G的简单重复序列。端粒序列对于维持DNA分子两末端复制的完整性与染色体的稳定性方面发挥重要作用。②着丝点（centromere）序列：它是复制完成的两姐妹染色单体的连接部位。在细胞分裂中期，该序列与纺锤丝相连，使复制后的染色体平均分配到两个子细胞中，以维持遗传的稳定性。③复制源（replication origin）序列：它是细胞进行DNA复制的起始点。对于真核细胞来说，多个复制源序列可被成串激活，该序列处的DNA双链解旋并打开，形成复制叉。因此，一条DNA分子上可同时在多个复制源序列处形成多个复制叉，使得DNA分子可在不同部位同时进行复制。目前采用分子克隆技术，可将真核细胞染色体的端粒序列、着丝点序列及复制源序列拼接在一起构建成人工染色体，用于科学研究。



●图8-7　功能性染色体的三个DNA序列

此外，尚可根据DNA序列在基因组中的重复频率，将DNA的核苷酸序列分为3种类型：单一序列、中度重复序列和高度重复序列（详见第九章）。

RNA在染色质中含量很少，不同物种间或同一细胞不同生理状态下差异很大，大部分是新转录的RNA前体。

（二）组蛋白是构成真核细胞染色体的基本结构蛋白

组蛋白（histone）是构成真核染色体的基本结构蛋白，是一组等电点大于10.0的碱性蛋白质，且富含带正电的碱性氨基酸赖氨酸和精氨酸，因此可以与带负电荷且呈酸性的DNA紧密结合。在真核细胞中，按组蛋白的精氨酸/赖氨酸的比值，将组蛋白分为5种：H_1、H_2A、H_2B、H_3、H_4。按其功能的不同，则可将组蛋白分为两类：①核小体组蛋白（nucleosomal histone），包括H_2A、H_2B、H_3、H_4四种，核小体组蛋白各两分子组成八聚体，构成核心颗粒，协助DNA卷曲成核小体的稳定结构。它们没有种属及组织特异性，在进化上高度保守，如牛和豌豆的H_4组蛋白的102个氨基酸中仅有2个不同；②H_1组蛋白，在构成核小体时起连接作用，与核小体的进一步包装有关。每个核小体只有一个H_1组蛋

白，分布在封闭 DNA 进入和离开组蛋白八聚体核心的位点上。H_1 不仅具有种属特异性，还有组织特异性，如哺乳类细胞的 H_1 组蛋白约有 6 种亚型。

组蛋白在 S 期于胞质中合成后转入核内，协助折叠及包装 DNA 形成染色体，还可保护DNA 不被酶消化。组蛋白还可通过甲基化或乙酰化修饰来抑制或激活某些基因的转录，参与基因的调控。

（三）非组蛋白能从多方面影响染色体的结构和功能

非组蛋白（nonhistone）是除组蛋白之外的染色质结合蛋白的总称，它参与维持染色体的结构以及催化酶促反应。与组蛋白相比，非组蛋白数量较少但种类较多，且在不同组织细胞中的种类与数量均不相同。非组蛋白可与染色体上特异的 DNA 序列结合，协助 DNA 分子折叠，参与启动 DNA 复制，调控基因的转录。

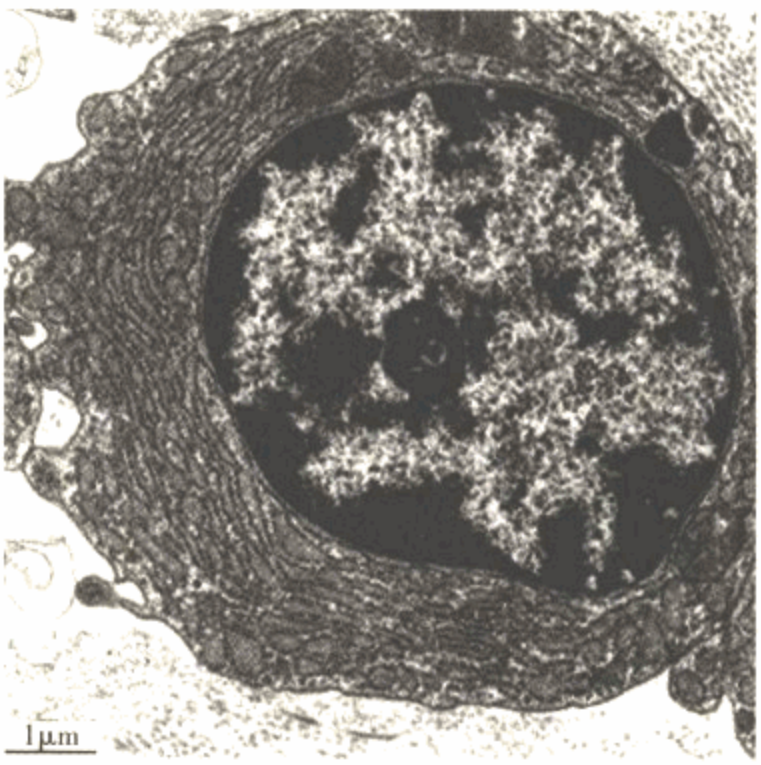
近年来，高迁移率组（high mobility group，HMG）非组蛋白备受关注。它是真核细胞内继组蛋白之后含量最为丰富的一组染色质非组蛋白，因其在聚丙烯凝胶电泳中的高迁移率而得名。HMG 蛋白可与染色质动态的、可逆的结合，常附着于活性基因部位。HMG 蛋白家族广泛参与多种重要的核内生物学功能，如调控 DNA 复制、转录、重组以及参与 DNA 损伤后的修复过程等。其中最为重要的功能是调控基因的转录。HMG 蛋白通过与染色质或 DNA 发生结合，使其变形或弯折，影响其与基因表达有关的结构，促进其他调节蛋白的结合，借以调节基因的转录。

二、常染色质与异染色质

间期染色质按其形态特征与染色性质的不同可分为两类：常染色质与异染色质。常染色质和异染色质虽在螺旋化程度、DNA 序列及功能上存在显著差别，但其化学本质是相同的，只是不同功能状态下染色质的不同构型而已（图 8-8）。在一定条件下，二者可以相互转变。

（一）常染色质是间期细胞核中处于伸展状态的染色质纤维

常染色质（euchromatin）为间期核内碱性染料染色时着色较浅，螺旋化程度较低，处于伸展状态的染色质细丝，含有基因转录活跃部位。常染色质的 DNA 成分主要由单一序列 DNA 及中度重复序列 DNA（如组蛋白基因和 tRNA 基因）构成，在一定程度上控制着间期细胞的活动。常染色质上还存在一些核酸酶敏感位点，故易被核酸酶降解。电镜下可见常染色质在核内均匀分布，多位于核中央。一部分常染色质介于异染色质之间，一部分以袢环形式伸入核仁内，伴随核仁存在。常染色质多在 S 期的早、中期复制。



●图 8-8　异染色质（核内深染区）和常染色质（核内浅染区）

（二）异染色质是间期细胞核中处于凝缩状态的染色质纤维

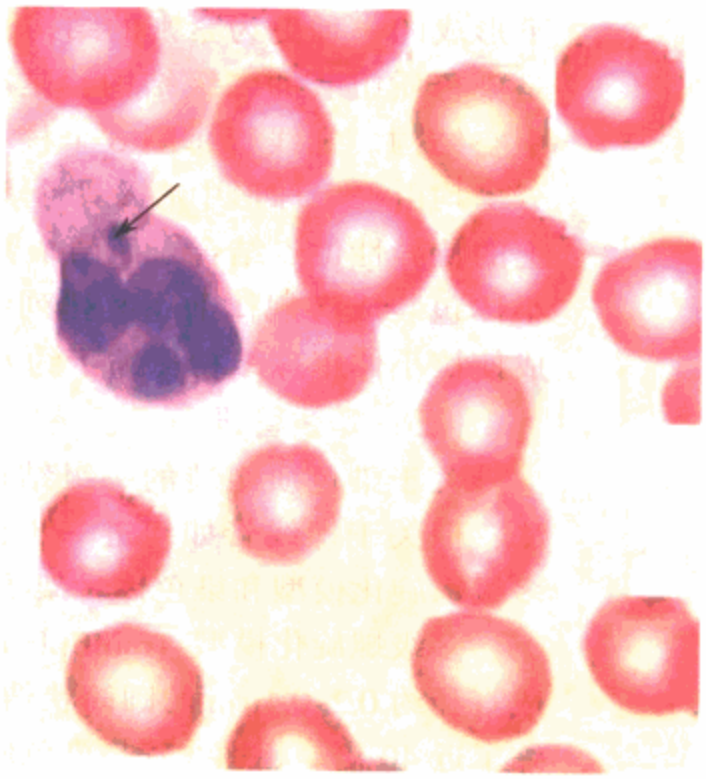
异染色质（heterochromatin）在间期核中处于凝缩状态，结构致密，无转录活性，用碱性染料染色时着色较深。异染色质无转录活性，是遗传惰性区。电镜下可见异染色质多位于核周近核膜处。异染色质包括结构异染色质（constitutive heterochromatin）和兼性异染色质（facultative heterochromatin）两大类。

结构异染色质是异染色质的主要类型，在所有细胞类型及各个发育阶段中均处于凝集状态，多定位于着丝粒区、端粒、次缢痕或染色体臂的凹陷部位，由相对简

单的高度重复序列构成，它参与染色质高级结构的形成。与常染色质相比，其复制行为表现为晚复制、早聚缩。

兼性异染色质是指在某些细胞类型或一定的发育阶段，原有的常染色质凝聚并丧失转录活性后转变而成的异染色质，它亦可转化为常染色质。雌性哺乳类动物体细胞核内的一对 X 染色体就属于兼性异染色质，其中一条为常染色质，另一条则为异染色质，间期固缩形成巴氏小体（Barr body）（图 8-9），受精后又转变为常染色体。人胚发育到 16 天后，一条 X 染色体就转变为巴氏小体，因此通过检查羊水中胚胎细胞的巴氏小体可预测胎儿的性别。

兼性染色质的总量变化与细胞类型有关，在分化程度较低的胚胎细胞中含量较少，在高度分化的细胞中含量则较多。随着细胞的分化，一些基因可因染色质凝聚而逐渐关闭，丧失其活性。因此，染色质的紧密折叠压缩可能是关闭基因活性的途径之一。



●图 8-9 白细胞中的巴氏小体
（箭头所指为巴氏小体）

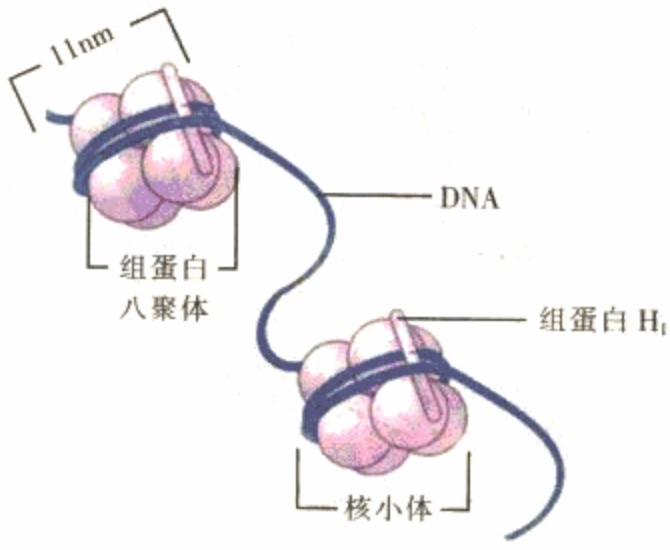
三、染色质组装成染色体

人每个体细胞核内均有 46 条染色体，其 DNA 成分含约数十亿个碱基对，总长达 2m，而细胞核的直径仅为 5~8μm。这意味着染色质 DNA 必须经一系列包装压缩近万倍形成短棒状的染色体后，才能蜗居于中期细胞核内。染色质 DNA 需先包装成核小体，在此基础上进一步折叠、压缩，最终形成长度仅为几个微米的染色单体。这种高度有序的包装保证了遗传物质随细胞分裂而平均地分配到两个子细胞中。

（一）核小体是 DNA 片段缠绕组蛋白八聚体形成的染色体的基本结构单位

用非特异性核酸酶处理染色质，大多数情况下可得到大约 200bp 的片段，但处理裸露的 DNA 分子会得到长度不等的随机降解片段。以这个实验为基础，R. Kornberg 建立了核小体模型。目前认为，核小体（nucleosome）是染色体的基本结构单位，为直径 11nm 的圆盘状颗粒，由 200bp 左右的 DNA 分子及一个组蛋白八聚体构成（图 8-10），通常被称为染色质组装的一级结构。组蛋白八聚体是构成核小体的盘状核心结构，由四个异二聚体构成，包括 $H_2A \cdot H_2B$ 异二聚体和 $H_3 \cdot H_4$ 异二聚体各两个。其中两个 $H_2A \cdot H_2B$ 二聚体位于核心结构中央，两个 $H_3 \cdot H_4$ 二聚体位于四聚体两侧。每个组蛋白八聚体外有 146bp 的DNA 片段缠绕 1.75 圈，每圈 83bp。组蛋白核心常以特定的位点与 DNA 双螺旋小沟中富含 A-T 的区域结合，该位置的结合有利于 DNA 分子在组蛋白八聚体上的弯曲盘绕。

相邻的两个核小体间有一 DNA 片段相连，称为连接 DNA（linker DNA）。不同种属的连接 DNA 长度可有不同，为 0~80bp，平均为 60bp。故染色质中平均每 200bp 便出现一核小体，形成核小体串珠。核小体串珠的形成使 DNA 分子压缩了约 7 倍。组蛋白 H_1 就结合在连接 DNA 上，位于缠绕组蛋白八聚体的 DNA 双链的进出端，起稳定核小体的作用。



●图 8-10 核小体结构示意图

（二）核小体进一步螺旋形成螺线管

在电镜下观察发现，大多数染色质以一种 30nm 染色质纤维的形式存在，它是在核小体的基础上，在 H_1 参与

下形成的一种更为紧密的结构，是染色质的二级结构。目前普遍认为，螺线管（solenoid）是染色质组装的二级结构，是在组蛋白 H_1 存在的情况下，由核小体串珠结构盘旋而成的中空结构。螺线管每圈 6 个核小体，螺距 11nm，外径 30nm，内径 10nm。每个组蛋白 H_1 分子均由一个球形中心及两个氨基酸臂组成，通常位于螺线管内部，球形中心可与核小体上的特异性位点结合，而两个臂则与相邻核小体组蛋白核心上相应的位点结合，以协助核小体包装成有规律的重复排列结构。组蛋白 H_1 对螺线管的稳定起重要作用。螺线管的形成使核小体串珠结构压缩了约 6 倍。

（三）螺线管进一步包装成染色体

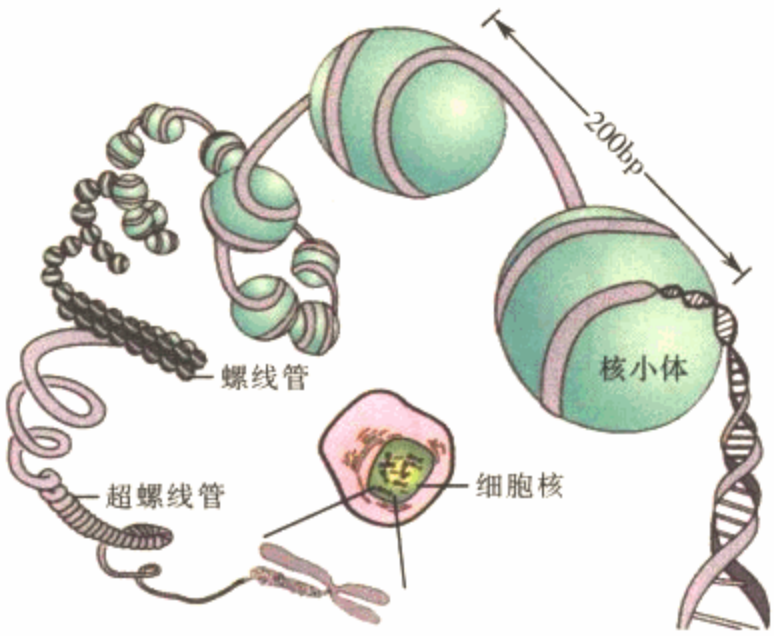
关于染色质组装的一级结构（核小体）与二级结构（螺线管），已取得基本一致的看法，但关于螺线管如何进一步包装成染色体尚有不同意见。目前有两种模型被广泛接受：多级螺旋化模型和染色体骨架-放射环模型。

多级螺旋化模型（multiple coiling model）（图 8-11）中，30nm 的螺线管进一步螺旋化形成直径约 0.2~0.4μm 的圆筒状结构，称为超螺线管（supersolenoid）。该过程使螺线管结构压缩了近 40 倍。超螺线管是染色质包装的三级结构。超螺线管进一步螺旋折叠，则形成染色体的四级结构——染色单体。该过程使超螺线管结构压缩了近 5 倍。因此，根据多级螺旋模型，从 DNA 到染色体共经过了四级包装，DNA 长度共压缩了约 8 400 倍。

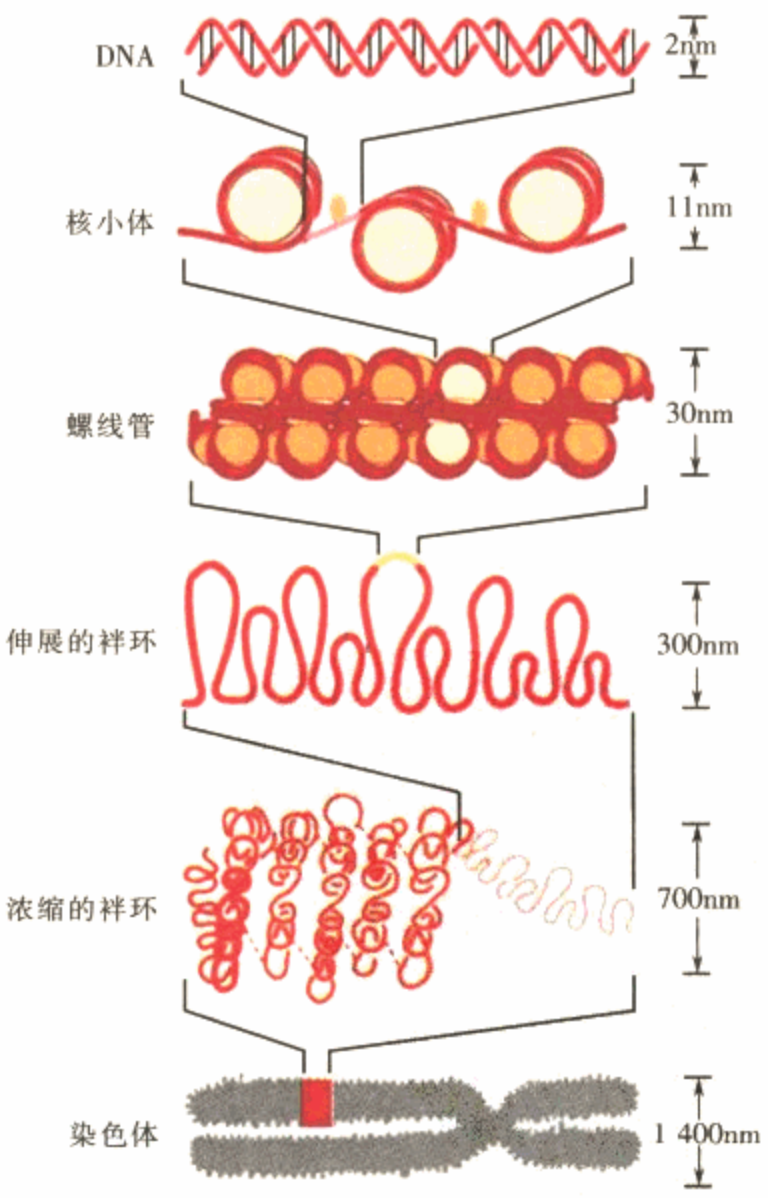
染色体骨架-放射环模型（scaffold-radial loop structure model）（图 8-12）则认为螺线管形成后，30nm 的染色质纤维折叠成袢环，沿染色体纵轴由中央向周围伸出，形成放射环。每个袢环包含核小体 315 个，每 18 个袢环呈放射状排列于同一平面上，并结合在核骨架上形成微带（miniband）。微带是染色质高级结构的组成单位，约 10^6 个微带沿纵轴排列形成染色单体。该模型与细胞分裂中期染色体的电镜下形态相吻合，并在某些特殊染色体如果蝇唾液腺细胞的多线染色体和两栖类动物的卵母细胞中的灯刷染色体中得到了验证。

四、染色体的形态结构

染色体（chromosome）是有丝分裂时遗

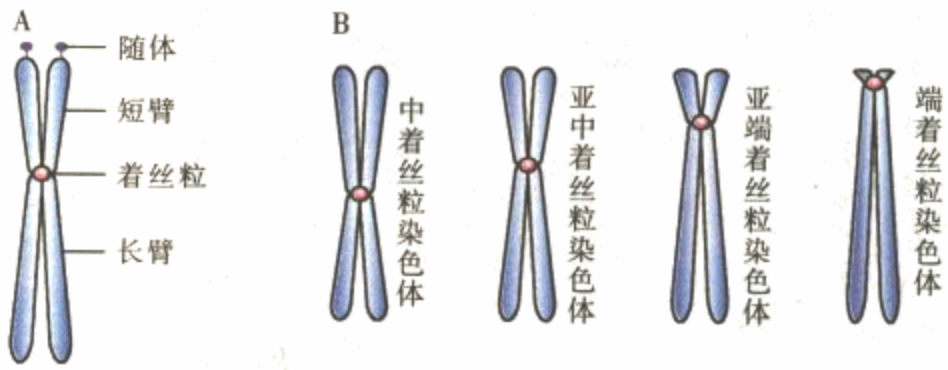


● 图 8-11　染色质组装的多级螺旋化模型



● 图 8-12　染色质组装的放射环模型

传物存在的特定形式，在细胞周期的不同时相其形态也有差异。间期染色质分散于细胞核；在分裂期，染色质则经盘旋折叠包装成大小不等、形态各异的短棒状染色体。由于分裂中期的染色体形态比较稳定，故常在分裂中期观察染色体形态或计数。中期染色体是由着丝粒（centromere）相连的两条姐妹染色单体(sister chromatid)构成，这两条染色单体是由同一个 DNA 分子复制而来，携带相同的遗传信息（图 8-13）。除着丝粒外，染色体上还可见主缢痕、次缢痕、端粒、随体等结构。



●图 8-13 中期染色体的结构特征与染色体的四种类型

A. 中期染色体的结构示意图 B. 不同的染色体类型示意图

（一）着丝粒位于两条姐妹染色单体的连接处

中期染色体的两条姐妹染色单体的连接处，有一向内凹陷、着色较浅的缢痕称为主缢痕（primary constriction）。着丝粒（centromere）是指主缢痕处的染色质部分，由高度重复的异染色质组成。

着丝粒可将每条染色单体分为两臂，依据着丝粒在染色体的位置，将中期染色体分为 4 类（图 8-13）：①中着丝粒染色体（metacentric chromosome）：着丝粒位于染色体中央，将染色体分为大致相等的两臂。②亚中着丝粒染色体（submetacentric chromosome）：着丝粒偏离染色体中央，将染色体分成长短不等的两臂，即长臂（q）和短臂（p）。③端着丝粒染色体（telocentric chromosome）：着丝粒位于染色体的一端，因而该类染色体仅有一个臂。④亚端着丝粒染色体（subtelocentric chromosome）：着丝粒靠近染色体的一端。

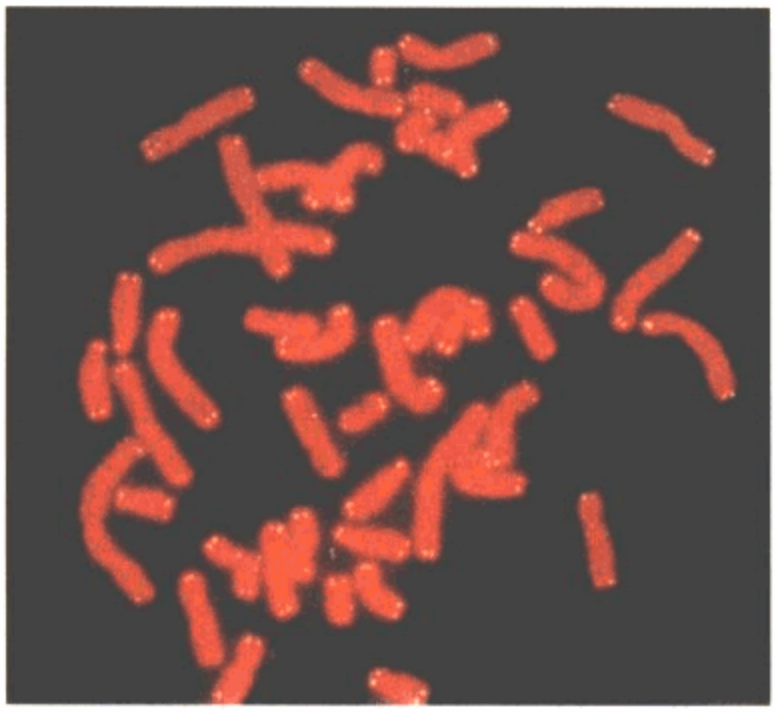
动粒（kinetochore）是电镜下观察到的，存在于主缢痕两侧的特化的圆盘状结构，由蛋白质构成，是细胞分裂时纺锤丝动粒微管的附着部位，参与细胞分裂后期染色体向两极的移动。

着丝粒-动粒区域是一种高度有序的、在结构和组成上非均一的整合结构，称为着丝粒-动粒复合体。该复合体至少包括三个不同的结构域：①动粒结构域（kinetochore domain）：位于着丝粒的外表面，由动粒和围绕动粒外层的纤维冠（corona）组成。在电镜下呈 3 层板状结构，即致密的外层、低密度的中层和致密的内层（与下面的染色质相连）。纤维冠主要是促使染色体分离的马达蛋白（motorprotein），与纺锤丝微管连接，是支配染色体的运动和分离的重要结构。②中心结构域（central domain）：位于动粒结构域的内表面，包括着丝粒的大部分区域，其中含有高度重复序列 DNA，中心结构域对着丝粒-动粒复合体结构的形成和功能活性的维持有重要作用。③配对结构域（pairing domain）：位于中心结构域内表面，是中期两条姐妹染色单体相互连结的位点，与姐妹染色单体的配对及分离关系密切。在此区域发现有两类蛋白，一类为内着丝粒蛋白（inner centromere protein），另一类为染色单体连接蛋白（chromatid linking protein）。

着丝粒-动粒复合体的 3 种结构域在组成及功能上虽有区别，但当细胞进入有丝分裂时，它们彼此间却可相互配合、共同作用，保证有丝分裂过程中染色体与纺锤体的结合，为染色体有序的配对及正确分离提供了结构基础。

（二）次缢痕并非存在于所有染色体上

次缢痕（secondary constriction）是染色体上除主缢痕之外的缢缩部位。每种生物染色体组中至少有一条染色体上有次缢痕。由于其数量、位置和大小是某些染色体的重要形态特征，故可用作鉴别染色体的标记。



●图 8-14　端粒
原位杂交实验显示位于人染色体末端的端粒
（以含有 TTAGGG 序列的 DNA 作为探针）

（三）端粒是位于染色体两端的特化结构

1938 年，遗传学家 H. J. Müller 用 X 射线处理果蝇时发现，染色体末端很少发生倒位或缺失现象，推测染色体末端一定存在着某种特殊结构，该结构对染色体的稳定至关重要，称之为端粒（图 8-14）。研究已证明，端粒（telomere）是染色体末端的特化部位，由富含鸟嘌呤核苷酸（G）的端粒 DNA 和蛋白质构成。一个基因组内所有端粒都是由相同的短串联重复序列构成，该重复序列具有种属特异性；端粒蛋白则可保护端粒免受酶类等的降解。端粒的生物学作用在于维持染色体的稳定性与完整性，参与染色体在核内的空间排布及同源染色体的正确配对。

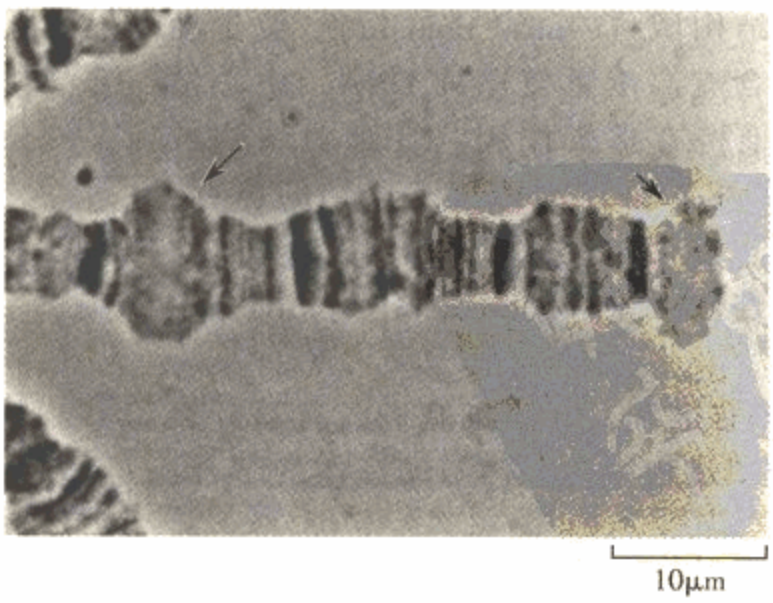
除上述功能外，端粒 DNA 还可能与细胞寿命及癌变等有关。端粒 DNA 的长度随着细胞分裂次数的增加及年龄的增长而逐渐缩短，当缩短到一定程度时，细胞将退出细胞周期而分化或死亡。肿瘤细胞中含有端粒酶，它由蛋白质及与端粒 DNA 互补的 RNA 构成，该酶以自身的 RNA 为模板合成端粒 DNA，以弥补丢失的端粒 DNA 片段。因此，肿瘤细胞的端粒 DNA 长度在细胞分裂过程中可维持不变，可能是肿瘤细胞永生化的原因之一。

（四）随体是位于染色体末端的球形或棒状结构

随体（satellite）是位于染色体末端的球形或棒状结构，主要由异染色质构成，它通过次缢痕区与染色体主体部分相连。有随体的染色体则称为 sat 染色体。随体的形态、大小及其在染色体上的位置总是固定的，故随体是识别染色体的重要形态特征之一。

（五）核仁组织区位于染色体的次缢痕部位

核仁组织区（nucleolar organizing region）是含有 rRNA 基因（5S rRNA 基因除外）的一段染色体区域，该部位 rRNA 基因转录活跃，染色质凝集程度低，表现为浅染的次缢痕，与核仁形成有关。但并非所有的次缢痕都是核仁组织区。rRNA 基因是从染色体上伸出 DNA 袢环，每个 rDNA 袢环就是一个核仁组织者。

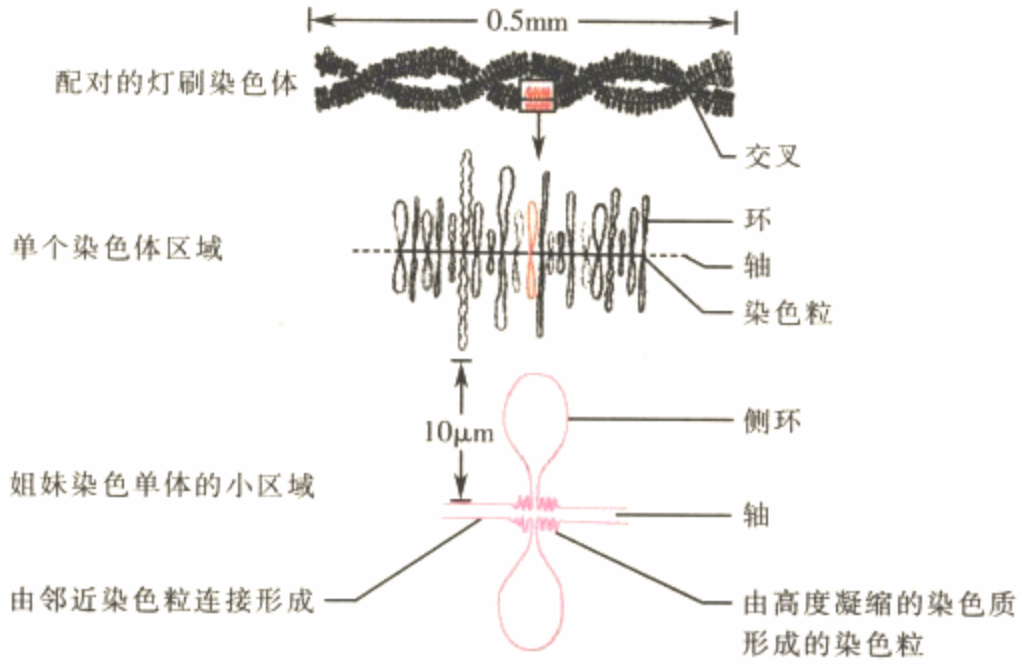


●图 8-15　多线染色体
光镜下显示的果蝇多线染色体。
箭头所指较为膨松的区域是 RNA 活跃转录的区域

（六）特殊类型的染色体

1. 多线染色体　多线染色体（polytene chromosome）是在双翅目摇蚊幼虫的唾液腺细胞中发现的，是指一条染色体含有多条染色单体的现象。复制后的染色单体并不分离，它们平行排列相互连接在一起。随着细胞周期循环次数（即染色单体复制次数）的增加，多线染色体的多线性逐渐提高，其直径也不断增大，在光镜下表现为沿染色体纵轴的一系列深浅交替的带与间带。研究表明，大多数基因分布于带上，间带上仅存在少数基因。在果蝇发育过程中，多线染色体的某些带膨大，形成蓬松的袢环样结构，每个袢环具有一个基因，随着转录的进行，袢环将逐渐由折叠状态变为伸展状态（图 8-15）。

2. 灯刷染色体　灯刷染色体（lampbrush chromosome）是普遍存在于鱼类、两栖类等动物的卵母细胞中的一类形似灯刷的特殊巨大染色体（图 8-16）。通常出现在卵母细胞第一次减数分裂的双线期，两条同源染色体通过几处交叉而相连，含四条染色单体。由染色粒（chromomere，深染的高密度颗粒）串联组成染色单体的主轴，由主轴染色粒向两侧伸出成对侧环，染色粒是染色单体紧密折叠区域，是不转录的片段；侧环是 DNA 转录活跃区域。一套灯刷染色体约有 10 000 个侧环。每个侧环由一个转录单位或几个转录单位组成。灯刷染色体是研究基因表达极为理想的实验模型。



●图 8-16　灯刷染色体

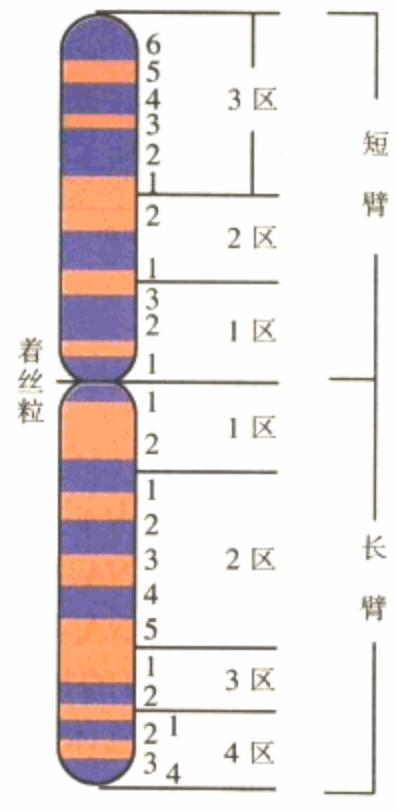
五、核型与染色体带型

核型（karyotype）是指某一个体细胞的全部染色体在有丝分裂中期的表型，包括染色体的数目、大小和形态特征。核型分析是指在对染色体进行测量计算的基础上，进行分组、排队、配对，并进行形态分析的过程。由于细胞有丝分裂中期的染色体结构清晰，所以常把有丝分裂中期的染色体作为观察核型的对象。人类正常男性体细胞核型为：46,XY；正常女性则为 46,XX。

通常采用普通染色和显带染色技术来辨别染色体。普通染色是用普通染料使整条染色体均匀着色，在显微镜下根据染色体形态和着丝粒位置等外形体征来识别染色体，但并不能辨别所有染色体且精确度不高。显带染色则可精确识别每一条染色体，还能检测各条染色体的微小结构变化，如缺失、易位等。

显带技术是将染色体经过一定处理，用特定的染料染色后，使染色体沿其长轴显示深浅各异、宽窄不等的带纹，构成了染色体的带型（band）（图 8-17）。目前常用荧光染料喹吖因显示 Q 带；碱或胰蛋白酶等处理后用 Giemsa 染色显示 G 带等。

染色体显带技术最重要的应用就是明确鉴别任何一条染色体，甚至某一易位片断。它对于探讨人类遗传病的发病机制、物种间的亲缘关系以及远缘杂交的鉴定等都有重要意义。



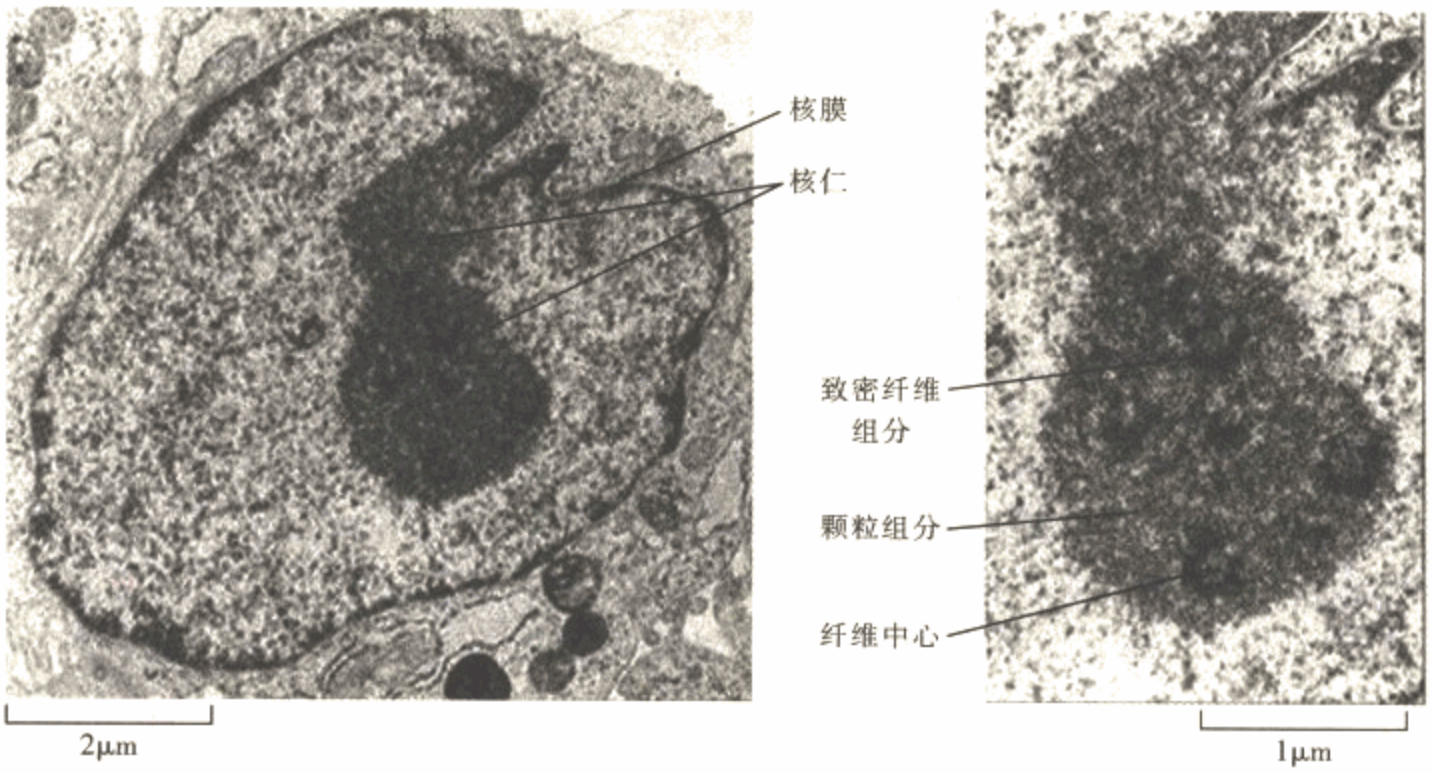
●图 8-17　1 号染色体的带型示意图

第三节　核　　仁

核仁（nucleolus）是真核细胞间期核中最明显的结构，光镜下为均匀、海绵状的球体。每个细胞中有核仁 1~2 个，甚至多个。核仁的大小及数目随生物体的种类及生理状态的变化而有所不同，特别是与蛋白质的合成水平密切相关。在蛋白质合成旺盛的细胞如卵母细胞、分泌细胞中，核仁很大；在肌肉细胞等不具备蛋白合成能力的细胞中，核仁很小。核仁在细胞中的位置通常不固定，可以位于任何部位，但在生长旺盛的细胞中，常趋向核的边缘，靠近核膜，即发生“核仁趋边”的现象。这种分布可能有利于核内外物质的交换。

一、核仁的形态结构和化学组成

核仁的主要化学组成为 RNA、DNA、蛋白质和酶类等。蛋白质含量很高，占 80%，RNA 占 11%，DNA 占 8%。核仁中的核酸部分主要是 rRNA 基因及其转录产物。与细胞内的其他细胞器不同，核仁无膜包裹，而是由多种成分构成一种大的网络结构。电镜下可以看到三个不完全分隔的区域：纤维中心；致密纤维组分；颗粒成分（图 8-18）。



●图 8-18　人成纤维细胞的核仁电镜照片（引自 Alberts B，2002）
A.完整的核仁　B.局部观察的照片

（一）核仁的纤维中心是分布有 rRNA 基因的染色质区

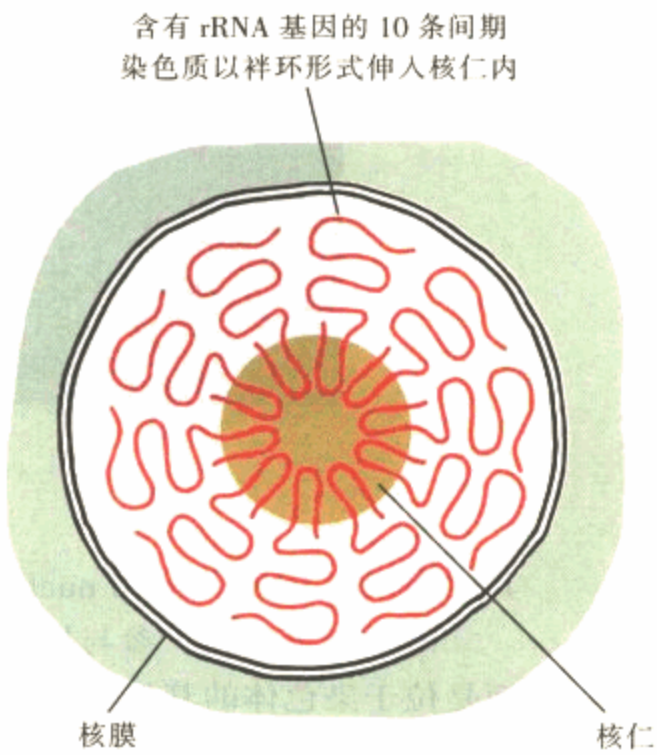
纤维中心（fibrillar center）是电镜下包埋于颗粒组分内部的低电子密度的圆形结构体，是 rRNA 基因 rDNA 的存在部位。rDNA 实际上是从染色体上伸展出的 DNA 袢环，在袢环上 rRNA 基因串联排列，进行高速转录，产生 rRNA，组织形成核仁，因此，每一个 rRNA 基因的袢环称为一个核仁组织者（nucleolar organizer）。rRNA 基因通常分布于几条不同的染色体上，人类 rRNA 基因位于 5 条染色体上，即 13、14、15、21、22 号染色体，因此，在二倍体的 46 条染色体上，就有 10 条分布有 rRNA 基因，它们共同构成的区域称为核仁组织区（图 8-19）。在许多情况下，核仁组织区定位在核仁染色体次缢痕部位。

（二）核仁结构的致密纤维含有处于不同转录阶段的 rRNA 分子

致密纤维组分（dense fibrillar component）是核仁内电子密度最高的区域，由致密的纤维构成，呈环形或半月形包围纤维中心。电镜下该区由紧密排列的细纤维丝组成，直径一般为 5~10nm，主要含有正在转录的 rRNA 分子，核糖体蛋白及某些特异性的 RNA 结合蛋白，如核仁纤维蛋白（fibrillarin）、核仁素（nucleolin）等。电镜原位分子杂交表明 rRNA 以很高的密度存在于致密纤维组分内。

（三）核仁结构的颗粒成分由正在加工和成熟的 RNA 及蛋白质构成

电镜下，核仁的颗粒成分（granular component）呈致密的颗粒，颗粒直径 15~20nm。颗粒成分由正在加工、成熟的核糖体亚单位的前体颗粒构成，多位于核仁的外周，是代谢活跃的细胞核仁中的主要结构。间期核中核仁大小的差异主要是颗粒组分数量上的不同造成的。



●图 8-19 人间期细胞核仁组织区及 10 条染色体的 rDNA 袢环

此外，核仁区含有一些无定形物质，称核仁基质（nucleolar matrix），纤维中心、致密纤维组分和颗粒成分均存在于核仁基质中。在核仁中还可见到包围在核仁周围的异染色质即核仁周围染色质（perinucleolar chromatin），核仁周围染色质与含 rDNA 的常染色质统称为核仁相随染色质（nucleolar associated chromatin）。

核仁的结构与 rRNA 的转录，加工以及核糖体亚单位装配是密切相关的：纤维中心是 rDNA 的存在区域，rRNA 的转录发生在纤维中心与致密纤维组分的交界处，这样 rRNA 前体转录出来后，首先在致密纤维组分处开始加工，同时有些加工过程可能在颗粒成分处进行，rRNA 加工完成后，在颗粒成分处与核糖体蛋白装配成核糖体亚单位。总之，核仁的 3 种基本结构结合在一起，共同完成核仁的功能。

二、核仁的功能

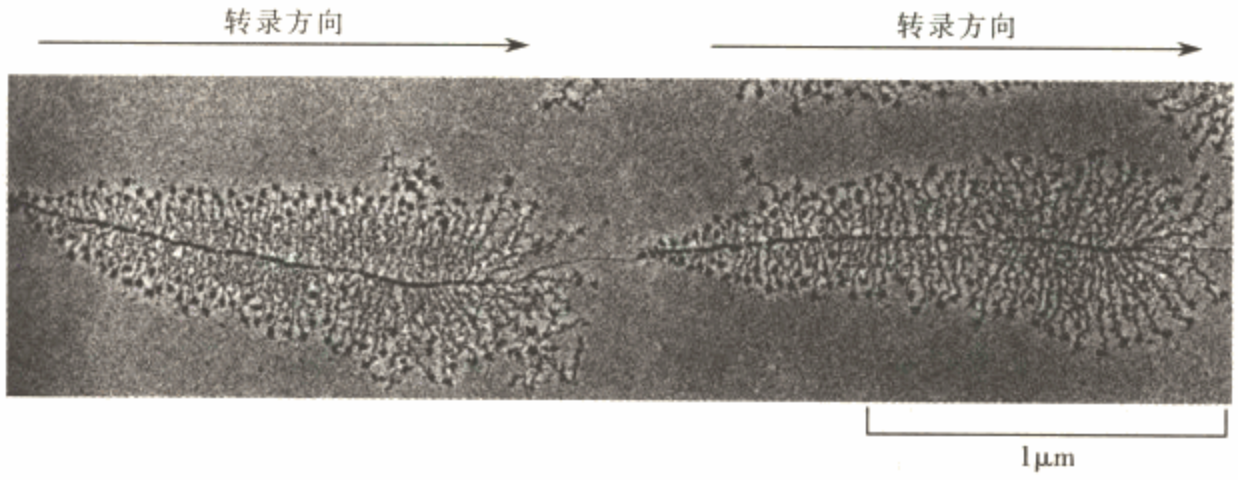
核仁是 rRNA 合成、加工及核糖体亚单位装配的场所。除 5S rRNA 外，真核生物的所有 rRNA 都是在核仁内合成的。构成核糖体亚单位的多种蛋白质在细胞质合成后被转运至核仁，并在此装配成核糖体亚单位，而后成熟的核糖体再转运到细胞质参与蛋白质的合成。

（一）核仁是 rRNA 基因转录和加工的场所

哺乳动物核仁中串联重复排列的 rRNA 基因，在 RNA 聚合酶Ⅰ作用下进行转录，每个基因都转录出长度为 13 000bp 的初始转录产物，即 45S rRNA。

由于 rRNA 基因分布于很小的核仁组织区，成簇串联重复排列，这种组织方式及高密度分布使 RNA 聚合酶Ⅰ能够连续运作，在前一个基因转录完成后直接活化下一个基因的转录，保证转录的高效进行。应用染色质铺展技术，可在电镜标本上观察到 rDNA 转录为 rRNA 的形态学过程：沿 rDNA 长轴垂直方向，伸展出一系列新生的 rRNA 链，沿着转录的方向，其长度逐渐增长，形成类似于“圣诞树”的形状（图 8-20）。这种转录而成的 45S rRNA 前体紧接着被进一步加工，形成成熟的 rRNA。

哺乳动物 45S rRNA 前体经过加工修饰，最终形成 5.8S rRNA、18S rRNA、28S rRNA。



●图 8-20　rRNA 基因转录的形态

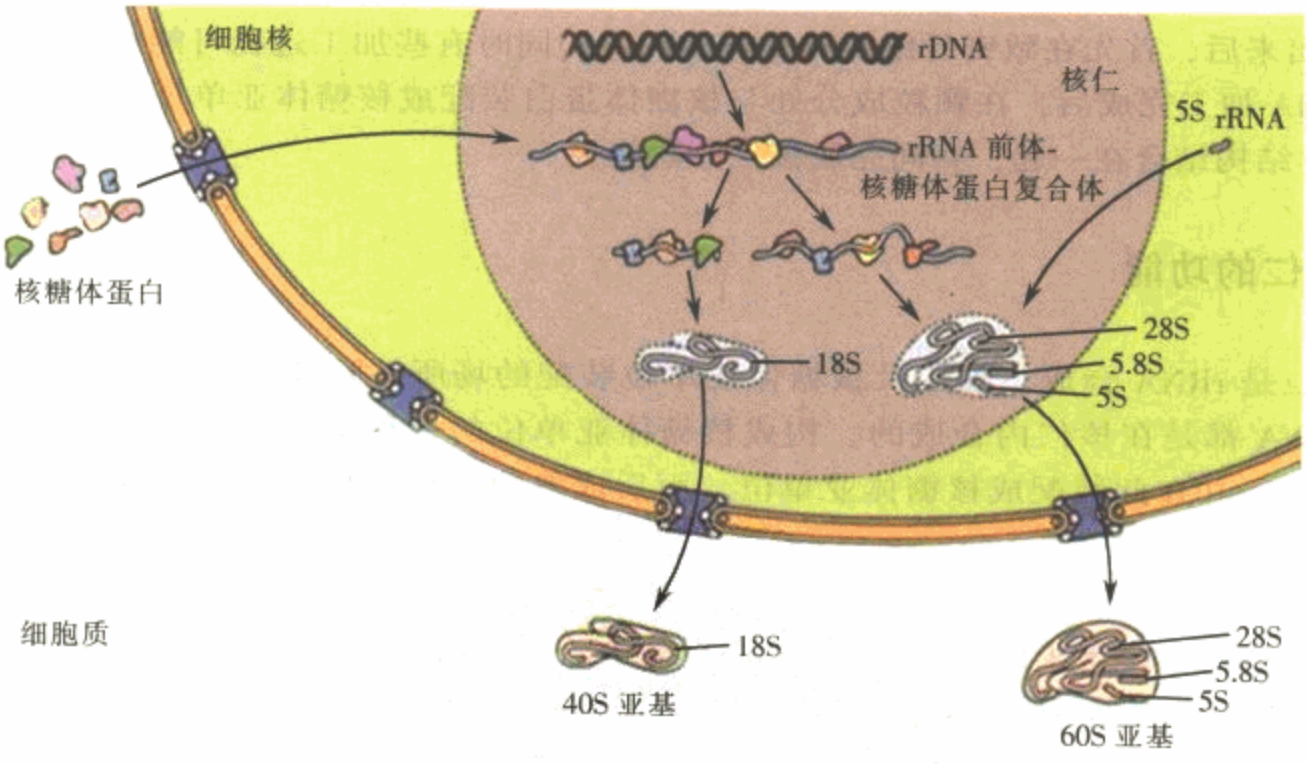
其中小核仁 RNA（small nucleolar RNA，snoRNA）在这一加工过程中起着非常重要的作用。

需要指出的是，参与核糖体形成的 5S rRNA，其编码基因不存在于核仁的 rDNA 区域，而是位于染色体的其他区域。5S rRNA 基因也串联成簇排列，但不是由 RNA 聚合酶Ⅰ催化的，而是由 RNA 聚合酶Ⅲ负责转录的，经加工后被转运至核仁处参与核糖体亚基的组装。

（二）rRNA 与核糖体蛋白在核仁内组装成核糖体的大、小亚基

rRNA 前体不是以游离的方式，而是与蛋白质形成核糖核蛋白复合体后再进行加工的。在核仁，新合成的 45S rRNA 前体很快与来自胞质的 80 多种蛋白质结合形成核糖核蛋白复合体，在酶的催化下，失去一些 RNA 和蛋白质，裂解形成 28S rRNA，18S rRNA 和 5.8S rRNA，其中 28S rRNA、5.8S rRNA 连同来自核仁外的 5S rRNA 与 49 种蛋白质装配成 60S 大亚基，18S rRNA 与 33 种蛋白质装配成 40S 小亚基（图 8-21）。

在核仁中装配成的核糖体大、小亚基经核孔输送到细胞质，在细胞质中进一步装配成成熟的功能性核糖体。



●图 8-21　核糖体亚单位的组装

三、核仁周期

在进行有丝分裂的细胞中，核仁出现一系列结构与功能的周期性变化，称为核仁周期（nucleolar cycle）。当细胞进入有丝分裂时，核仁首先变形和变小；之后随着染色质凝集，

所有 RNA 合成停止，含 rRNA 基因的 DNA 袢环逐渐收缩回到相应染色体的核仁组织区；至中期和后期核仁消失；在有丝分裂末期，核仁组织区的 DNA 解凝集，rRNA 重新开始合成，组成核仁的物质聚集成数个分散的前核仁体（prenucleolar body），并在染色体核仁组织区附近融合成极小的核仁，它们进一步融合，最终形成核仁。

核仁在有丝分裂过程中发生周期性变化的分子机制尚不十分清楚。研究表明，rRNA 基因活性和 RNA 聚合酶Ⅰ在间期细胞核仁结构的维持及有丝分裂后核仁结构的重建方面起重要作用。选择性抑制 rRNA 基因活性后，致密纤维成分很快解离并引起核仁解体；将RNA 聚合酶Ⅰ抗体注射到有丝分裂中期的细胞内，可以阻止核仁的重新形成。

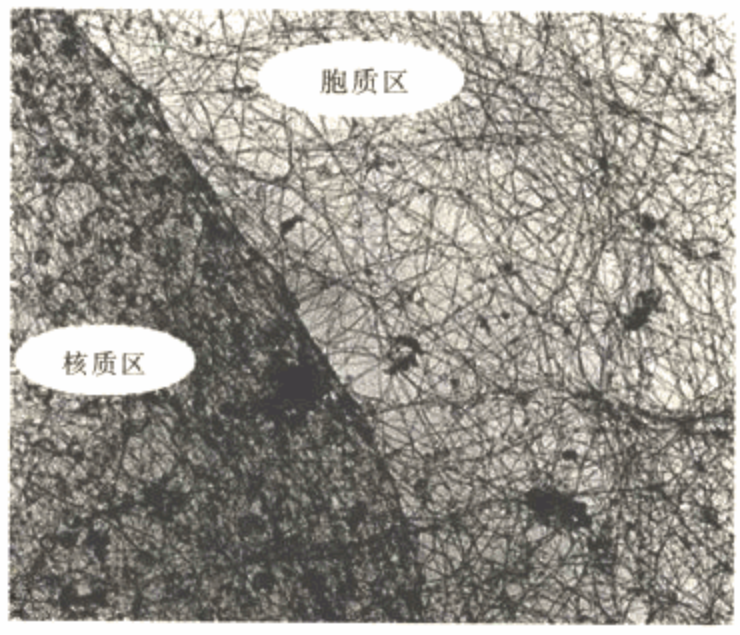
第四节 核 骨 架

核骨架（nuclear scaffold）又称核基质（nuclear matrix），是指真核细胞间期核中除核膜、染色质和核仁以外的部分，是一个以非组蛋白为主构成的纤维网架结构。由于它的基本形态与细胞质中的细胞骨架相似，并具有一定的联系，因之被称为核骨架。

一、核骨架的形态结构与化学组成

核骨架为充满整个核空间的三维蛋白网架。电镜下可见，核骨架由粗细不均、直径为 3~30nm 的纤维组成，纤维单体的直径为 3~4nm，较粗的纤维是单体纤维的聚合体（图 8-22）。对核骨架的形态观察最初是采用从大鼠肝细胞中分离出的细胞核，即将纯化的细胞核先用核酸酶消化，再用低盐和高盐缓冲液处理，最后用去污剂洗涤，去除 DNA、RNA、组蛋白与脂类等成分，得到一个以纤维蛋白成分为主的纤维网架结构，即核骨架。核骨架分布于整个核空间，纤维交错排列，构成网架结构，同时与核纤层纤维和核孔复合体相互连结，构成核内互为关联的骨架系统。此外，核骨架细胞质中的中间纤维在结构也有相互联系。

核骨架的化学组成较复杂，它不同于胞质骨架，并非由专一的蛋白质成分组成。由于抽提方法不同，获得的核骨架蛋白成分有一定差异。目前已确定的核骨架蛋白有百余种，多数为非组蛋白性的纤维蛋白。核骨架蛋白可分为两类：一类是核基质蛋白（nuclear matrix protein），是各类细胞共有的蛋白成分；另一类是核基质结合蛋白（nuclear matrix associated protein），其组成与细胞类型、分化状态、生理及病理状态有关。此外，在核骨架中还有少量RNA，它对于维系核骨架三维网络结构的完整性是必需的。



●图 8-22 核骨架的透射电镜图像

对小鼠成纤维细胞的核基质，先用去垢剂、高盐提取，再用核酸酶和低盐处理除去染色质镶嵌 DNA，得到由残存的纤维状基质构成的核骨架和细胞骨架的胞质区

二、核骨架的功能

核骨架是细胞核内一个非常重要的纤维网络结构，它不仅在维持细胞核的形态方面，而且在染色体组装、DNA 复制和基因转录调控等一系列活动中发挥重要作用。

（一）核骨架是 DNA 复制的支架

早期的研究通常先去除细胞中的不溶性物质，在可溶性上清中研究 DNA 复制，认为可溶性的 DNA 聚合酶结合于 DNA 复制起始点并沿模板移动，合成子链 DNA。后来发现，在粗提物中，如在含核骨架成分的非洲爪蟾卵提取物中，DNA 复制效率很高；而在高度纯化的提取物（完全可溶性成分）中，DNA 复制效率很低，且复制错误较多。这说明 DNA 的复制需要一个结构支架。

来自体外培养的大鼠肝细胞和 3T3 细胞的研究发现，以 ^{3}H-TdR 进行脉冲标记，然后分离核骨架进行测定，在核骨架上发现了大量被标记的 DNA 分子，表明核骨架是构成 DNA 复制的空间支架。近年有相关实验显示，DNA 聚合酶和 DNA 拓扑异构酶在核骨架上有特定的结合位点，DNA 与参与 DNA 复制的酶及因子锚定于核骨架上，形成 DNA 复制复合体（DNA replication complex），进行 DNA 复制。DNA 复制点连续不断地结合在核骨架上，这进一步证实了核骨架可能是 DNA 复制的支撑物。

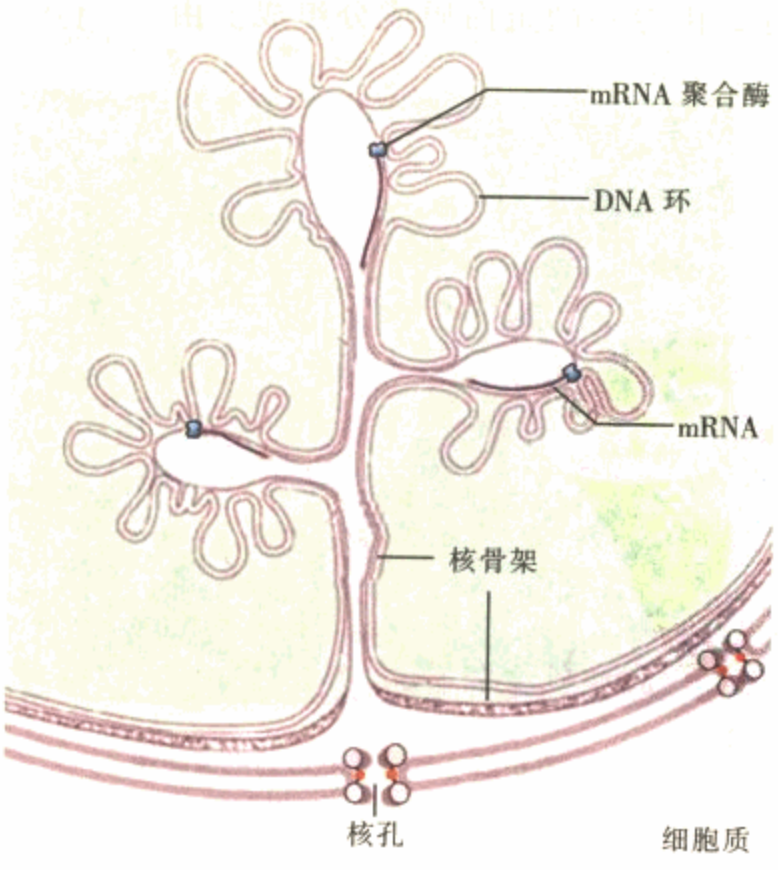
（二）核骨架在基因转录过程中发挥重要作用

研究表明，RNA 合成是在核骨架上进行的，核骨架与基因的转录以及转录后 RNA 加工修饰和定向运输密切相关。在鸟类和哺乳动物细胞中发现，具有转录活性的基因是结合在核骨架上的，核骨架上也存在 RNA 聚合酶的结合位点，基因 DNA 只有结合在核骨架上才能进行转录。DNA 上含有核骨架结合序列，一般位于 DNA 放射环或活性转录基因的两端，核骨架结合序列上存在 DNA 拓扑异构酶Ⅱ作用位点（DNA 拓扑异构酶Ⅱ是核骨架组分之一），因此，DNA 可能通过核骨架结合序列与 DNA 拓扑异构酶Ⅱ的结合锚定在核骨架上。

hnRNA 的加工与核骨架也有一定的关系，核骨架可能是细胞核内 hnRNA 加工的场所。如 ^{3}H-UTP 标记实验显示，高比活性发生在与核骨架结合的高分子量的 RNA 上。更有人具体指出，hnRNA 上的 PolyA 区可能就是 hnRNA 在核骨架中的附着点。

在一些疾病中发现，某些核骨架蛋白或核骨架相关蛋白异常表达，可以引起基因表达失控，也提示核骨架在基因表达过程中的重要作用。

（三）核骨架参与染色体和核膜的构建



●图 8-23　DNA 放射环与核骨架关系的模式图

如前所述，染色体是由一条 DNA 分子经过反复折叠形成的高度螺旋化结构。染色体组装的骨架-放射环模型指出，由核小体紧密包裹形成的 30nm 染色质纤维可进一步折叠形成袢环样结构，这种袢环可结合在核骨架上构建形成染色体。近年来的研究表明，DNA 放射环能够通过其两端的核骨架结合序列锚定在核骨架上（图 8-23）。由此推断，核骨架可能对核内 DNA 的空间构型起着维系和支架作用，参与DNA 超螺旋化的稳定和高度有序化过程。但目前对染色体支架是否就是核骨架还在探讨之中。

核骨架也参与有丝分裂后期核膜的重建。研究发现，核膜重建过程中需要核基质相关蛋白 AKAP149（A-kinase anchoring protein 149）与 PP1（protein phosphatase 1）的结合。

此外，病毒的 DNA 复制和基因转录与宿主细胞的核骨架有密切关系。如腺病毒 mRNA 前体的合成及加工修饰是在核骨架上完成的。核骨架蛋白在肿

瘤发生过程中也起一定的作用。与正常细胞相比，某些肿瘤细胞中含有特异性核骨架蛋白成分。如白血病细胞与正常骨髓细胞相比，就出现了一些新的核骨架蛋白成分，而缺少了正常骨髓细胞所拥有的某些核骨架蛋白；在膀胱癌、肝癌及胃癌等肿瘤中也发现了核骨架蛋白的改变。

第五节　细胞核的功能

细胞核是真核细胞最重要的细胞器，是遗传物质DNA 存在的主要部位，其主要功能是遗传信息的贮存、复制和转录，是细胞生命活动的控制中心。

一、遗传信息的贮存

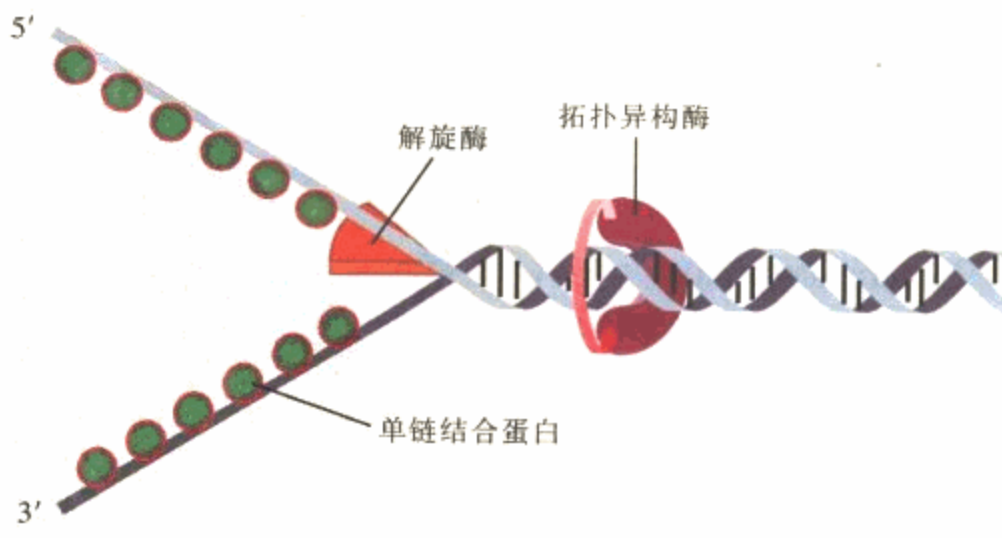
细胞核内的 DNA 是生物体遗传信息的携带者，决定着生物体的遗传性状与生物学行为。在组成 DNA 分子的线性核苷酸序列中蕴藏着丰富的遗传信息，DNA 分子中多达 4^n 的核苷酸的不同排列顺序决定了遗传信息的多样性与复杂性。生物体携带遗传信息的基本结构单位是基因。基因是 DNA 分子中一段具有一定生物功能的核苷酸序列，控制着生物某一特定的性状。携带遗传信息的 DNA 分子与组蛋白结合形成复合体后，通过有序的组装及高度的压缩储存于染色体中，使 DNA 分子稳定在细胞核内。细胞核将遗传物质以核膜包裹在核内，核膜通过区域化作用确保了 DNA 的复制、转录和损伤修复在一个相对稳定的内环境中进行，保证了细胞的遗传稳定性，也有利于真核细胞在细胞分裂后产生的两个子细胞间的平均分配，维持个体世代交替中遗传信息的稳定。

二、遗传信息的复制

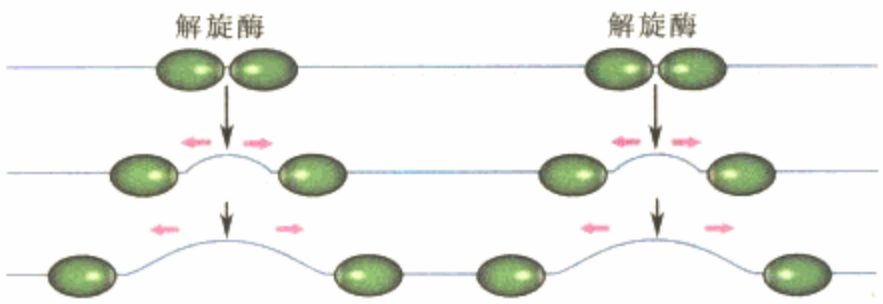
作为遗传物质的 DNA 必须正确的复制其核苷酸序列，以维持遗传信息的稳定性和延续性。DNA 在复制过程中，以自身为模板复制产生的子代 DNA 双链中，一条为亲代模板 DNA 链，另一条为与其互补的新链，这称为 DNA 的半保留复制（semiconservative replication）。真核细胞 DNA 复制具有双向性、多起点、不连续性等特征。

（一）真核生物的 DNA 复制是在多个起始点上进行的不连续复制

DNA 复制不是在染色体 DNA 上随机进行的，而只能在一些特定的复制起点处开始。复制起点处的 DNA 双链在 DNA 解旋酶、拓扑异构酶的协助下，解开双螺旋结构，单链结合蛋白结合与单链 DNA 上，致使解开的双链与未解开的双链之间形成叉状结构，称为复制叉（replication fork）（图 8-24）。复制从起点开始双向进行直到终点为止，每一个这样的 DNA 单位称为复制子（replicon）。病毒和细菌等低等生物细胞中，DNA 复制只有一个起始点，而真核细胞基因组庞大，每一个染色体上有多个复制起点，例如人类基因组中估计有 10^4~10^5 个复制起点。因此，真核细胞在 DNA 复制时，可同时从多个起点进行双向复制。一个复制起点的两个复制叉向两侧推进，最终将与



●图 8-24　复制叉形成示意图



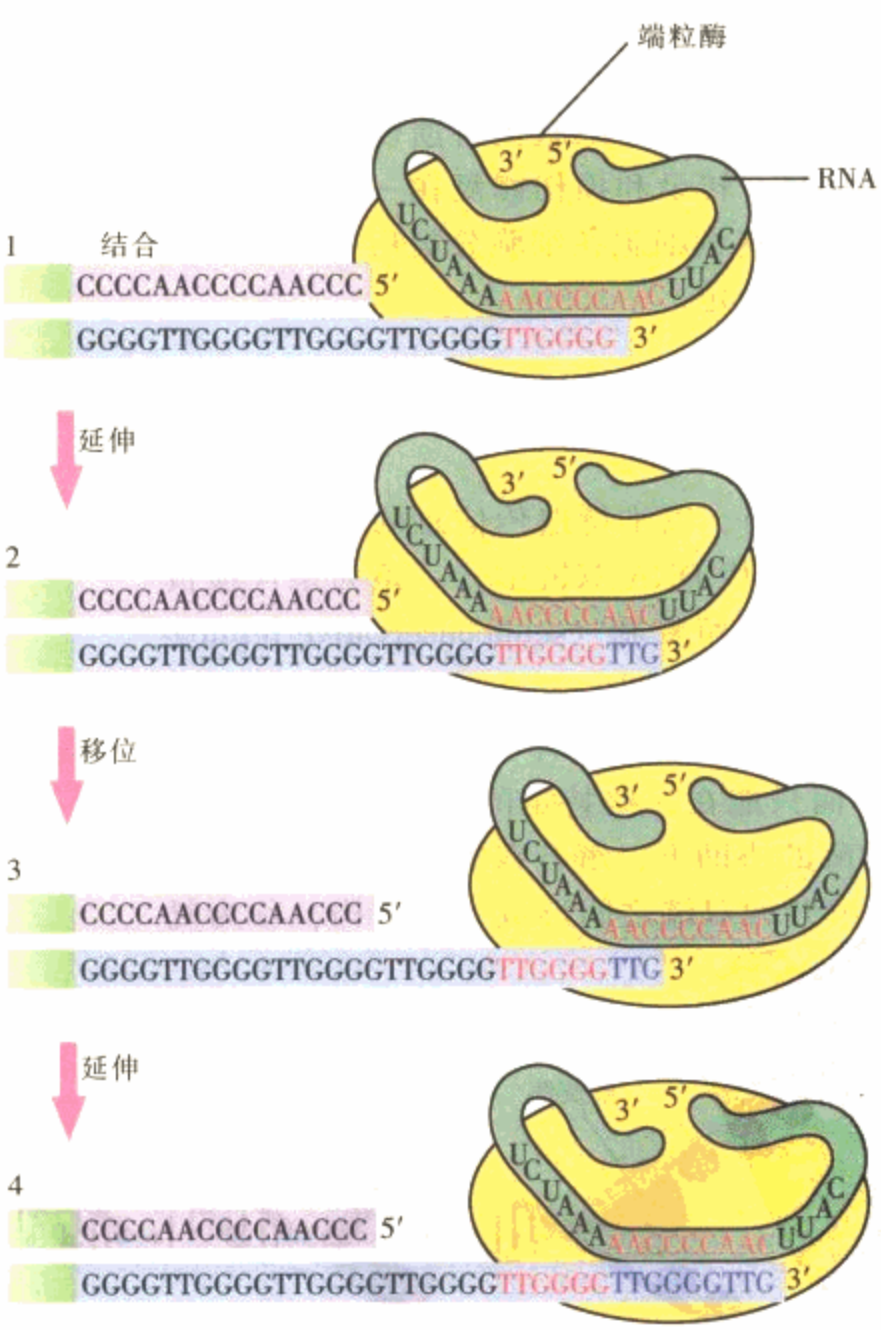
●图 8-25　DNA 的多起点复制示意图

另一个起始点的复制叉相连，在电镜下可观察到一个个呈泡状结构的复制子（图 8-25）。

DNA 复制时，脱氧核糖核苷只能加在新合成 DNA 链的 3′端，即 DNA 只能按从 5′到 3′的方向合成。因为 DNA 双螺旋的两条链反向平行，所以在复制时新生成的一条链的合成的方向和复制叉前进的方向相同，可以连续复制，称为前导链（leading strand）；而另一条新生链合成的方向与复制叉前进的方向相反，不能连续复制，只能合成一些短的、不连续的 DNA 片段，最后经 DNA 连接酶的作用形成完整的新链，称为后随链（lagging strand）。形成后随链的不连续 DNA 片段被称为冈崎片段（Okazaki fragment）。

（二）DNA 复制过程中需要多种酶和蛋白质的参与

细胞的 DNA 复制是一个 DNA 聚合酶催化的酶促反应。在原核细胞（大肠杆菌）的 3 种 DNA 聚合酶中，DNA 聚合酶Ⅲ负责基因组 DNA 的复制。真核细胞中，有 4 种不同的 DNA 聚合酶 α、β、δ、ε，DNA 聚合酶 α 和 δ 是核 DNA 的复制酶，DNA 聚合酶 α 的功能相当于原核细胞中的 DNA 聚合酶Ⅲ。一些 DNA 聚合酶同时还具有从 3′到 5′的外切酶活性，切除复制过程中错配的碱基，确保 DNA 复制的忠实性。



●图 8-26　端粒酶的作用

端粒酶通过其 RNA 序列识别染色体富含 G 的末端，并与之结合。在端粒酶作用下，延长染色体 DNA 的 3′末端，随着端粒酶在染色体末端的移位，3′末端被进一步延长

除了 DNA 聚合酶以外，DNA 的复制还需要其他的一系列酶参与复制过程，包括解旋酶、拓扑异构酶、引物酶、连接酶以及端粒酶等。

（三）端粒酶能够保持 DNA 复制时染色体末端的完整性

端粒酶是一种在 DNA 复制终止时发挥作用的酶，其功能是保持 DNA 复制时染色体末端的完整性。端粒酶的化学本质是由 RNA 与具有逆转录酶活性的蛋白质组成的核酸蛋白复合体，其 RNA 长 159bp，含一 CAACCC-CAA 序列，能为染色体端粒 DNA 的合成提供模板。

在 DNA 复制时，由于后随链冈崎片段的 RNA 引物的存在，使得 DNA 合成不能进行到后随链的模板 DNA 的 3′末端，即 3′末端最后一段序列（端粒）不能被完全复制。主要存在于未分化细胞和肿瘤细胞中的端粒酶通过其自身的 RNA 模板，与端粒序列识别并结合，利用它所含有的蛋白质的逆转录酶活性，能够对 DNA 3′末端进行加尾延长，以保证后随链 DNA 合成的正常进行，从而避免了多轮复制后造成染色体末端基因的丢失（图 8-26）。

三、遗传信息的转录

转录的本质是将遗传信息从 DNA 传递给RNA 分子，是细胞合成蛋白质所必需的重要环节。RNA 转录与加工在核内进行。RNA 前体在细胞核内先进行剪接以去除内含子，并进行必要的修饰如 5′端带帽与 3′端加尾，mRNA 加工成熟后才能进入细胞质指导蛋白质的合成，这确保了真核生物基因表达的准确性与高效性。

第六节 细胞核与疾病

细胞核是细胞生命活动的控制中心，它通过调控基因的复制、转录和加工影响细胞的生物学行为。细胞核的结构和功能异常经常会导致各种疾病。特别是在发生癌变的细胞中可观察到明显的核形态改变。

一、细胞核形态异常与肿瘤

与正常细胞相比，肿瘤细胞通常具有高的核质比，核结构呈异型性，表现为核外形不规则，核表面突出或向内凹陷，核分叶，核出芽，核呈桑葚状或弯月形等。染色质多聚集在近核膜处，并呈粗颗粒状，大小不等，分布不均匀。核仁呈高 rRNA 转录活性，表现为体积增大，数目增多，反映出肿瘤细胞代谢活跃、生长旺盛的特点。同时，构成染色质的组蛋白磷酸化程度增加，使分子中赖氨酸所带电荷改变，降低与 DNA 的结合，促进转录。此外，由于进行频繁的物质转运，核孔数目显著增加。

二、染色体异常与肿瘤

染色体异常被认为是肿瘤细胞的一大特征，几乎所有的肿瘤细胞都有染色体的畸变，包括数目异常和结构异常。肿瘤细胞染色体的数目常偏离正常的二倍体，出现超二倍体，亚二倍体及多倍体；形态不规则，表现为易位、重复、缺失、倒位、环状等。染色体的改变随细胞恶性程度的增加而增加，如果对患者的细胞进行染色体检查时，出现非整倍染色体和标记染色体，便可确定为恶性变化，可作为肿瘤诊断的客观指标。如费城（Ph）染色体见于慢性粒细胞白血病（CML）细胞中，研究表明它是一种染色体易位的产物，由 22 号染色体长臂与 9 号染色体长臂之间部分区段的易位形成，大约 95%的 CML 有 Ph 染色体，所以可作为诊断的依据，是该病的标记染色体。此外，在视网膜母细胞瘤中可见 13 号染色体长臂的中间缺失，在 Wilms 瘤中可见 11 号染色体短臂的中间缺失。

一般认为，染色体畸变虽不是肿瘤发生的始发因素，但可能是细胞癌变过程中的重要环节，与肿瘤发生过程中诸如基因的激活、基因的扩增及基因的丢失等重要事件有关，是目前相关领域的研究热点。有关基因与疾病的关系在此不作介绍。

小结

细胞核是真核细胞最重要的细胞器，是细胞生命活动的控制中心。典型的间期细胞核主要由核膜、染色质、核仁和核骨架几部分组成。核膜将细胞核与细胞质分成两大结构与功能区域，使基因的转录与翻译在时间上和空间上分开。核孔复合体是细胞核与细胞质之

间的物质交换和信息交流的通道。核纤层是附着于内核膜下的由核纤层蛋白组成的纤维蛋白网，它不仅为核膜及染色质提供结构支架，还参与了 DNA 的复制与基因转录。

染色质是间期细胞核中遗传物质的存在形式，主要由 DNA、组蛋白和非组蛋白组成。间期染色质可分为常染色质与异染色质两类，在一定条件下，二者可以相互转变。核小体是构成染色质的基本结构单位，主要由约 200bp 的 DNA 分子盘绕组蛋白八聚体构成。核小体串珠进一步组装成螺线管，螺线管包装后形成染色体。染色体是有丝分裂时遗传物质的特殊存在形式，中期染色体形态比较稳定，由着丝粒相连的两条姐妹染色单体构成。一个细胞中的全部染色体在有丝分裂中期的表型称为核型，不同物种的细胞核型是不同的。

核仁是间期细胞核中最显著的结构，主要由纤维中心、致密纤维组分和颗粒成分构成。核仁是一个高度动态的结构，在有丝分裂过程中表现出周期性的消失与重建，是 rRNA 合成、加工及核糖体亚单位装配的场所。

核骨架是细胞核中一个以非组蛋白为主构成的纤维网架结构，它不仅在维持细胞核的形态方面，而且在染色体组装、DNA 复制和基因转录调控等一系列活动中发挥重要作用。

细胞核是遗传物质 DNA 存在的主要部位，是遗传信息的贮存、复制和转录的场所。细胞核的结构与功能异常与肿瘤等疾病密切相关。

（张钦宪）

第九章　基因信息的传递与蛋白质合成

人类对基因的认识和探索经历了近百年的历程，这个历程是从奥地利的一个神父孟德尔（J. G. Mendel）的重大发现开始的。孟德尔的豌豆杂交试验提出了“一个因子决定一个性状”。1892年，A. Weisman提出“种质说”，指出染色体是种质。1926年，T. H. Morgan全面提出了基因论。1928年，F. Griffith提出的肺炎球菌转化实验。1944年，O. T. Avery等发现肺炎球菌转化实验的转化因子是DNA，解答了基因的化学本质问题。1952年，A. D. Hershey和M. Chase的噬菌体感染试验更进一步确证了核酸是遗传物质的观点。1953年，J. Watson和F. Crick提出了DNA的双螺旋模型。1958年，M. Messelson和F. W. Stahl利用同位素标记试验证实了DNA以半保留的方式进行复制。同年，Crick提出分子生物学的“中心法则”，阐明了从DNA到蛋白质的遗传信息流动方向和过程。1970年H. Temin和D. Baltimore分别从RNA病毒中分离得到了一种酶（逆转录酶），阐明了生物界中的另外一种遗传信息流动方向即从RNA到DNA。后来“朊病毒（prion）”概念的提出，提示蛋白质也可能是遗传信息的载体，这一观点则对“中心法则”提出新的挑战。

第一节　基因及其结构

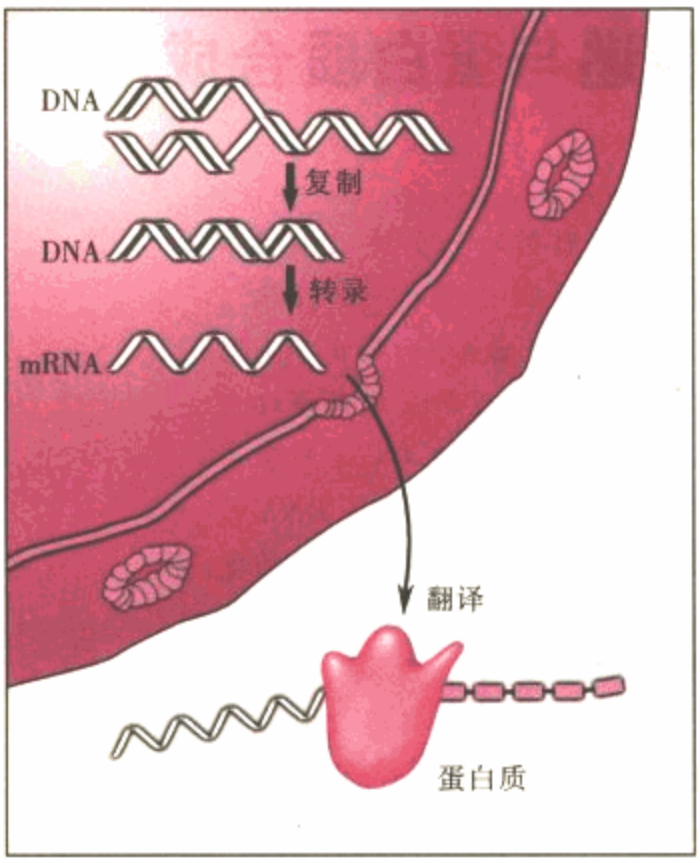
一、基因及其信息流向

（一）基因是DNA分子中含有特定遗传信息的核苷酸序列

细胞的生物学性状是由其遗传物质所携带的遗传信息决定的，绝大多数的遗传物质是DNA，少数噬菌体和病毒的遗传物质是RNA。基因（gene）是细胞内遗传物质的最小功能单位，是负载有特定遗传信息的DNA片段。在原核细胞中，一个基因就是DNA分子的一个片段；但在真核细胞，一个基因可以是DNA分子的一个片段或是若干片段的组合。基因能够编码生物活性物质，其产物为各种RNA和蛋白质。为了区分调控途径中的成员和被调控的基因，目前一般将基因分为结构基因（structural gene）和调控基因（regulatory gene）。结构基因是指编码非调控因子的任何蛋白质和RNA的基因，其表达产物如结构蛋白、酶、rRNA和tRNA等；而调控基因则通过编码蛋白质或RNA来调节其他基因的表达。

构成DNA遗传信息的物质基础是DNA序列中的核苷酸排列顺序，不同的生物细胞中DNA所载有的遗传信息大小不一，基因数目不同，所合成的蛋白质种类不同，这也是生物物种丰富多彩的原因。蛋白质是生命活动的执行者，通过转录和翻译，基因DNA的编码序列决定了蛋白质的一级结构，从而决定蛋白质的功能。通过DNA的复制，基因所携带的遗传信息代代相传。

基因组（genome）是指细胞或生物体的一套完整的单倍体遗传物质，是所有染色体上全部基因和基因间的DNA的总和，它含有一个生物体进行各种生命活动所需要的全部遗传信息。原核细胞没有细胞核结构，其基因组以裸露DNA或RNA的形式存在于细胞中，其基因组结构较真核细胞简单。真核细胞基因组的复杂性和信息量的庞大程度远远超过原核细胞。研究表明，由于DNA存在编码区与非编码区，基因组的大小并不一定代表基因组的复杂性。例如，人类基因组约有3.0×10^9bp，但只有2~3万个基因，仅是大肠杆菌（*E.*



●图 9-1　“中心法则”示意图

coli）4 000 个基因的 5~7 倍；而蝾螈和百合花的 DNA 数量却是人类基因组的 10 倍，但这些生物的复杂程度显然比不上人类。

（二）中心法则揭示了基因的信息流向

基因是遗传信息的贮藏形式。在细胞内，遗传信息的流向一般是 DNA→RNA→蛋白质。首先以 DNA 作为模板合成 RNA 分子，接着 RNA 分子指导特定蛋白质合成，此过程称为基因表达（gene expression）。基因表达的终产物是蛋白质（也可以是 RNA）。遗传信息从 DNA 到 RNA 再到蛋白质的流动，称为分子生物学的中心法则（central dogma）（图9-1）。中心法则包括：①DNA 的复制，即遗传信息可由 DNA 分子的复制传给子代 DNA；②RNA 的转录（transcription），这是以 DNA 为模板合成 RNA 的过程；③蛋白质的翻译（translation），这是 RNA（mRNA）指导合成蛋白质的过程，即由 mRNA 的核苷酸序列转变为蛋白质的氨基酸序列。后来的研究发现了逆转录现象，逆转录酶能催化以 RNA 为模板合成 DNA，从而证明了遗传信息亦可反向传递，即从 RNA→DNA；另外，一些 RNA 病毒可以 RNA 为模板复制出新的 RNA，这些现象都是对中心法则的有益补充。

在遗传信息传递的过程中，RNA 分子起很重要的作用。负责翻译为蛋白质的 RNA，像信使那样携带着来自 DNA 的遗传信息到胞质核糖体指导合成蛋白质，因而称之为信使 RNA（messenger RNA，mRNA）。除 mRNA 外，核糖体 RNA（ribosomal RNA，rRNA）和转运 RNA（transfer RNA，tRNA）都是基因表达的终产物，它们不能被翻译成蛋白质，但为蛋白质合成所需要。细胞中还有一些小分子的 RNA 在遗传信息的表达调控中起重要作用。

二、基因的结构及特点

（一）原核细胞的基因结构较为简单

大多数原核细胞中只有一个 DNA 分子，即一条染色体。原核细胞基因组 DNA 的绝大部分可编码蛋白质，只有小部分不转录，为非编码区。在原核细胞中，功能相关的结构基因串联排列，受上游共同调控区的控制，同时转录，同时翻译，最终形成功能相关的几种蛋白质。如大肠杆菌中与乳糖代谢有关的酶有三种：β-半乳糖苷酶、β-半乳糖苷通透酶和β-半乳糖苷乙酰转移酶，编码这三种酶的结构基因分别为 *LacZ*、*LacY* 和 *LacA*，串联排列于大肠杆菌 DNA 的某一区段上。

位于结构基因上游的是启动子（promoter）序列，它是 RNA 聚合酶识别和结合的部位，可以控制在同一条 DNA 上紧密连接的一个或几个基因的转录。原核生物的启动子大约有 55 个碱基对长，其中包含有转录的起始点和 RNA 聚合酶的识别部位及结合部位。起始点是 DNA 模板链上开始进行转录作用的位点，以“+1”标识，在 DNA 模板上，从起始点开始顺着转录方向的区域称为下游；从起始点逆着转录方向的区域称为上游。识别部位是 RNA 聚合酶的 σ 因子识别 DNA 分子的部位，约有 6 个碱基对，其中心位于上游−35bp 处，所以称为−35 区，其共有序列是 5′-TTGACA-3′。结合部位是指在 DNA 分子上与 RNA 聚合酶核心酶紧密结合的序列，其长度大约是 7 个碱基对，其中心位于起始点上游的−10bp 处，因此将此部位称为−10 区。多种启动子的−10 区具有高度的保守性和一致性，

它们有一个共有序列或共同序列，为 5′-TATAAT-3′，又称为 Pribnow 盒（pribnow box）。在Pribnow 盒中的 DNA 双链容易解开，利于 RNA 聚合酶的进入而促使转录作用的起始。

原核细胞结构基因序列是连续的（没有内含子成分），在转录后不需要剪切和加工。

（二）真核细胞基因是不连续的断裂基因

与原核细胞相比，真核细胞基因组 DNA 含量要大得多，如人单倍体基因组 DNA 含量是大肠杆菌的近 700 倍。除了数量多，真核细胞的基因结构也更复杂。首先，基因序列由编码区（coding region）和非编码区（non-coding region）组成，编码区（编码序列）是不连续的，被非编码区（非编码序列）所隔断，因而真核细胞基因也称为断裂基因（split gene）。其次，在真核基因组中存在许多重复序列，有些碱基序列反复出现可达百万次以上。此外，真核细胞基因大小相差悬殊，如人血红蛋白 β-珠蛋白基因全长约 1 700bp，而 DMD（Duchenne's muscular dystrophy，假肥大型肌营养不良）基因全长可达 2 300kb。真核细胞基因结构的复杂性赋予了真核生物更为精细的功能。

1. 真核细胞基因由多个功能区域组成　真核基因一般是由若干内含子和外显子构成的不连续镶嵌结构的基因。除内含子和外显子之外，完整的基因还包括位于编码区上游的启动子和基因末端的终止子。

（1）外显子和内含子：原核细胞的基因往往是连续的，DNA 经转录后即可得到直接编码蛋白质的序列，而真核细胞基因中编码序列常常被非编码序列隔断，转录后需加工切去非编码序列成为成熟的 RNA，才能进行蛋白质的合成。通常人们把基因内部能够被转录，并能指导蛋白质生物合成的编码序列称为外显子（exon），把在基因内部能够被转录，但不能指导蛋白质生物合成的非编码的序列称为内含子（intron）。一个断裂基因可由若干个外显子和若干个内含子组成，基因中的外显子与内含子间隔排列，其转录的终产物为mRNA。

在内含子的 5′端多以 GT 开始，3′端多以 AG 结束，称 GT-AG 法则，是普遍存在于真核细胞基因中 RNA 剪接的识别信号。在 RNA 剪接加工后形成的成熟 mRNA 的 5′端和 3′端，都各有一段由 30 到数百个核苷酸组成的非翻译区（untranslated region，UTR）。

（2）启动子：启动子是基因上游的 DNA 序列，是控制转录的关键部位。启动子中含有特征性的核心序列，真核生物典型的启动子是由 TATA 盒及其上游的 CAAT 盒和/或 GC 盒组成。

在转录起始位点上游-25~-35 bp 区段是由 7~10 个碱基组成而以 TATA 为核心的序列，称为 TATA 盒（TATA box）。这一部位是 RNA 聚合酶及其他蛋白质因子的结合位点，与转录起始的准确定位有关。若 TATA 盒缺失，转录合成的 RNA 可有不同的 5′端。位于 TATA 盒的上游，距转录起始点-70~-80bp 区含有 CCAAT 序列，在-80~-110bp 区含有 GGGCGG 序列，这两段保守序列分别称 CAAT 盒（CAAT box）和 GC 盒（GC box），目前统称为上游启动子序列（upstream promoter sequence，UPS）或上游启动子元件（upstream promoter element，UPE），它们是许多蛋白质转录因子的结合位点。CAAT 盒和 GC 盒是基因有效转录所必需的 DNA 序列，主要控制转录的起始频率，基本不参与起始位点的确定。

（3）终止子：终止子（terminator）是存在于基因末端具有转录终止功能的特定序列。转录后形成发夹结构，使 RNA 聚合酶从模板上脱离，终止转录。

2. 基因家族是真核细胞中一组来源相同、功能相关的基因　真核细胞基因结构最显著的特征之一是存在许多基因家族（gene family）。基因家族是真核细胞基因组中来源相同、结构相似、功能相关的一组基因，是由一个祖先基因经重复和变异形成的。按照在基因组中的分布不同，基因家族可分为两类，一类是基因家族的成员成簇存在，串联排列于特殊的染色体区段上，形成基因簇（gene cluster），它们常可同时转录，合成功能相关或相同的产物，如组蛋白、rRNA 基因家族；另一类是基因家族成员分散存在，广泛地分布于整

个染色体，甚至可存在于不同的染色体上，如干扰素、珠蛋白等基因家族。

在基因家族中，有些成员不能产生有功能的基因产物，称为假基因（pseudogene），它们或是不能转录，或是转录后生成无功能的基因产物。假基因在核苷酸序列上与有功能的基因相似，它们可能来自同一祖先基因，只是在进化过程中某些成员的核苷酸序列中发生缺失、倒位、点突变而成为无功能的假基因。大多数基因家族都有假基因的存在，但数量很小。

3. 真核基因组中含有大量的 DNA 重复序列　在真核细胞基因组中，编码蛋白质的基因一般只有一个或几个拷贝，这称为单一序列（unique sequence）。除此之外，基因组中还含有大量的功能未知、有多个拷贝的 DNA 重复序列（repetitive sequence）。在动物细胞中，多达一半的 DNA 由 DNA 重复序列组成。根据 DNA 重复程度的不同，将其分为以下两种：

（1）中度重复序列：中度重复序列（moderately repetitive sequence）由相对较短的序列组成，重复次数在 10~1 000 之间。一般认为，中度重复序列属非编码序列，散在分布于基因组中，与基因调控有关。如人类 Alu 家族（Alu family）是人类基因组中含量最丰富的中度重复序列，占人类基因组的 3%~6%，长 300bp，Alu 家族成员约有 30 万个，因每个Alu 序列中隐含有一个限制性内切酶 Alu Ⅰ 的识别序列 AGCT 而得名。Alu 序列的功能可能与转录调节、hnRNA 加工有关。

某些编码功能性 RNA 和蛋白质的基因在基因组中的重复次数也达几十到几百次，它们串联排列于基因组的一定区域，如 rRNA 基因和 tRNA 基因等，从严格意义上讲，它们也属于中度重复序列。

（2）高度重复序列：高度重复序列（highly repetitive sequence）由基因组中非常短的序列（一般小于 100bp）组成，其在基因组中的重复次数在几千次以上，一般组成长的串联重复序列，常成簇分布于染色体着丝粒区及染色体的端部，如卫星 DNA。高度重复序列在哺乳动物基因组中的比例一般小于 10%，可能与基因表达调控及染色体结构维持有关，具体功能尚不清楚。

经典实验：内含子的发现

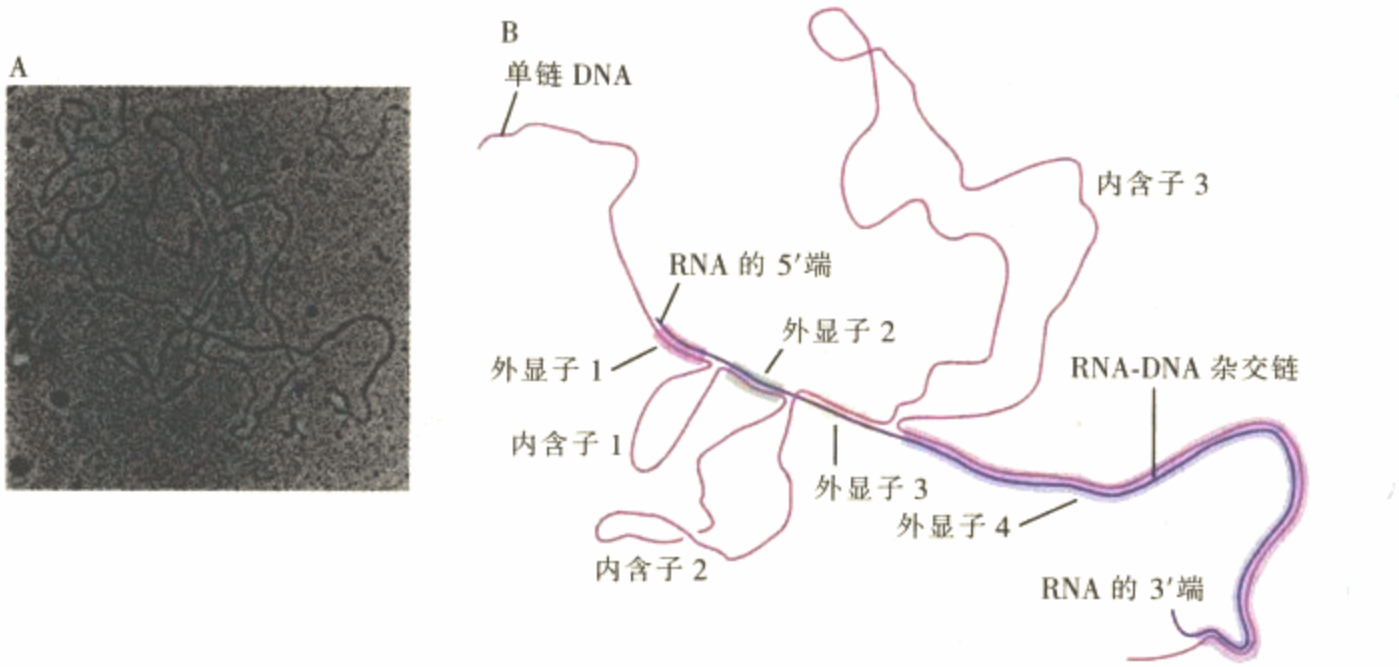
研究背景

在分子克隆技术出现之前，人们对真核细胞中 mRNA 的合成知之甚少，但已知在真核细胞中 mRNA 的合成过程比在细菌中复杂得多。真核细胞中 mRNA 的合成似乎不仅包括转录，还包括对初始转录产物的加工和修饰过程。当时推测，真核细胞可能首先在细胞核中产生一个较长的 mRNA 初始转录产物，接着被切割形成较小的 mRNA 分子，并被输送到细胞质中。在当时，人们认为这个切割过程包括去除初始转录产物的 5′末端和 3′末端部分的序列。根据这个观点，mRNA 被包含在较长的初始转录产物中，并且编码 mRNA 的DNA 序列应该是没有间断的。直至 RNA 剪接的发现，这一对真核细胞 mRNA 的认识才得以彻底改变。Phillip A. Sharp 和 Richard J. Roberts 两个研究小组于 1977 年分别独立地发现了剪接现象。

实验内容

Sharp 和 Roberts 两个研究小组都利用腺病毒 2 来研究人细胞中 mRNA 的合成过程。腺病毒 2 的优点是可以作为一个比宿主细胞更为简单的研究模型。病毒 DNA 可直接从病毒颗粒中分离出来，同时，编码病毒结构蛋白的 mRNA 含量丰富，可直接从感染细胞中纯化得到。Sharp 把他们的实验重点放在病毒结构多肽 hexon 的编码 mRNA 上。为了分析

hexon mRNA 序列在病毒基因组中的位置，他们将纯化的 hexon mRNA 与腺病毒 DNA 进行杂交，并利用电镜来观察杂交分子。结果显示，hexon mRNA 的主体序列能够与含有 *hexon* 基因的腺病毒 DNA 形成杂交分子。出乎意料的是，hexon mRNA 的 5′末端序列不能与编码 hexon mRNA 主体的 DNA 序列的邻近序列杂交。这表明 hexon mRNA 的 5′端可能来源于病毒基因组中其他位置的序列。通过 hexon mRNA 与 *hexon* 基因上游的 DNA 片段杂交实验证实了这种可能性。实验中 mRNA-DNA 杂交体形成了一个复杂的环状结构，hexon mRNA 的主体与先前证实的 hexon DNA 序列形成一长的杂交区域，令人惊奇的发现是hexon mRNA 的 5′末端与 hexon DNA 上游 3 个短序列发生了杂交。在电镜下可以看到 3 个大的单链 DNA 环，这些 DNA 环将 3 个短序列彼此分隔开，并也将 3 个短序列与 hexon mRNA 主体序列分隔开来（图 9-2）。由此可见，hexon mRNA 的 5′末端序列由病毒基因组的 3 个独立区域转录而来，是从一个长的初始转录产物中被剪接到 hexon mRNA 的主体上的。



●图 9-2　内含子的发现

A. 电镜图片　B. 根据电镜结果绘制的模式图

发表论文

Susan M. Berget, Claire Moore, and Phillip A. Sharp (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA):

Spliced segments at the 5′ terminus of adenovirus 2 late mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74 : 3171-3175

Louise T. Chow, Richard E. Gelinas, Thomas R. Broker and Richard J. Roberts (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, USA):

An amazing sequence arrangement at the 5′ends of adenovirus 2 messenger RNA. Cell, 1977, 12 : 1-8

后续影响

腺病毒 mRNA 的剪接现象被发现之后，相继进行了一系列关于细胞 mRNA 前体剪接的类似实验，结果显示真核基因存在一种此前未曾预料到的结构，即真核基因的编码序列不是连续的，而是被内含子所间隔。细胞通过对初级转录产物的剪接去除内含子。现已清楚，真核细胞基因组中存在大量的内含子，内含子在进化过程以及基因表达调控过程中的作用一直是生命科学研究的热点。剪接现象的发现也推动了对这种以前未曾认识到的RNA 加工机制的研究。这方面的研究不仅阐明了新的基因表达调控的机制，也

揭示了RNA的催化活性，为早期进化是以自我复制的RNA分子为基础的这一假说提供了重要证据。总之，腺病毒mRNA的剪接现象的发现对细胞生物学及分子生物学的多个领域产生了重大的影响。

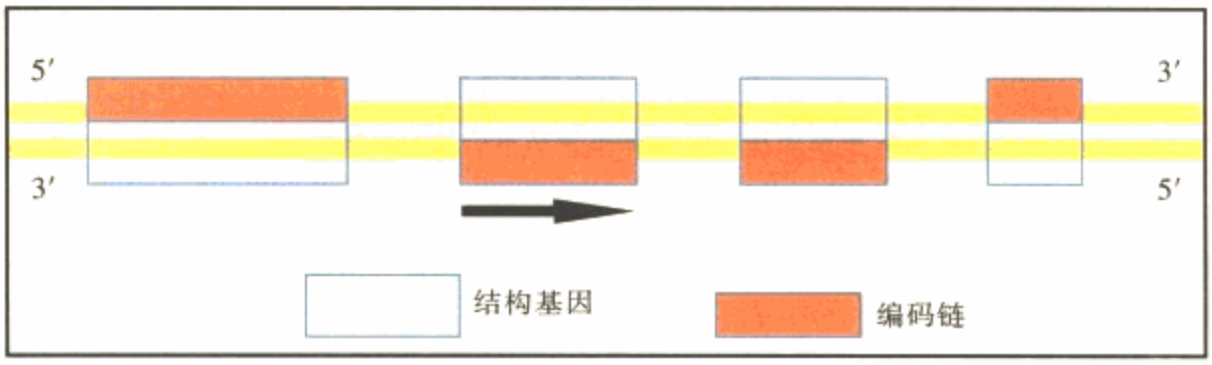
第二节　基因转录和转录后加工

一、基因转录的一般特点

基因转录是遗传信息从DNA流向RNA的过程，即将DNA分子上的核苷酸序列转变为RNA分子上核苷酸序列的过程。

DNA链是基因转录的模板。在双链DNA中，作为转录模板的链称为模板链（template strand）或反义链（antisense strand），即与mRNA互补的DNA链；与模板链互补的另一条链称为编码链（coding strand）或有意义链（sense strand），该链与转录产物的序列相同，只是在转录中将DNA中的T变为RNA中的U。模板链并非总在同一单链上，如图9-3所示，在DNA双链的某一区段，以其中一条单链为模板，而在另一区段，以其相对应的互补链为模板。这种DNA链的选择性转录也称为不对称转录（asymmetric transcription）。

转录的本质是一个以DNA双螺旋链中反义链为模板，以四种核苷三磷酸ATP、GTP、CTP、UTP为原料，在RNA聚合酶作用下，遵循碱基互补配对原则合成RNA的过程。RNA合成的方向是5′→3′，生成的RNA链与模板链反向平行，游离的NTP只能连接到RNA链的3′-OH端。在RNA合成中不需要引物。在真核细胞中，转录生成的RNA是初级转录产物，必须经过不同方式的加工和修饰才具有生物活性。



●图9-3　不对称转录

二、原核细胞的基因转录

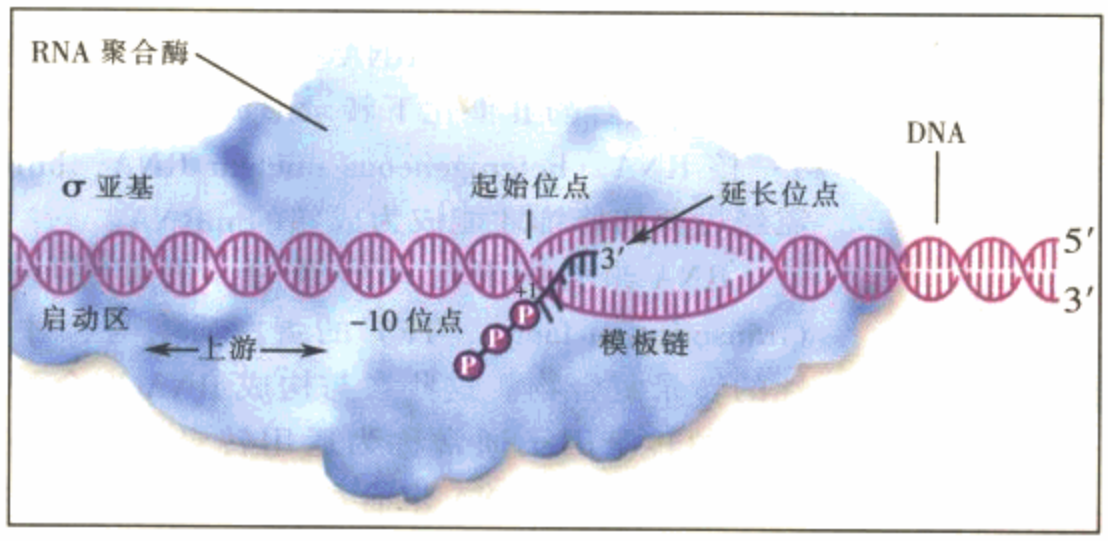
（一）RNA聚合酶和ρ因子是原核细胞基因转录的主要因子

1. RNA聚合酶　原核细胞中只有一种RNA聚合酶，催化转录形成各种RNA分子。大肠杆菌的RNA聚合酶是由4种不同亚基构成的复合体，记为$\alpha_2\beta\beta'\sigma$，称为全酶，没有σ亚基的复合体称为核心酶。σ亚基的主要功能是识别原核细胞基因上游的启动子，起动基因转录。核心酶的作用是催化RNA的聚合。其中β′亚基能与DNA模板结合，β亚基能与核苷三磷酸结合，并在磷酸二酯键形成中起作用。

2. ρ因子　ρ因子是一种蛋白质。当转录进行到基因末端时，ρ因子能识别终止信号并与之结合，使RNA聚合酶不能继续作用而使转录终止。

（二）原核细胞基因转录的基本过程通常被分为三个阶段

1. 转录起始阶段　首先 RNA 聚合酶的 σ 亚基识别基因上游的启动子，使全酶与启动子结合并形成复合体，这是转录起始的关键，随后 DNA 双链从局部被打开，以反义链为模板，按照碱基互补配对原则将第一个核苷三磷酸结合到模板的转录起始点上，并与第二个核苷三磷酸形成第一个磷酸二酯键。通常，当 RNA 链达 8~9 个核苷酸后，σ 亚基便从全酶解离出来，至此完成转录的起始（图 9-4）。



●图 9-4　原核细胞基因转录的起始

2. 转录的延长阶段　核心酶沿模板链 3′→5′方向移动，在滑行中使 DNA 双链不断解旋，并按模板的碱基序列配对加入相应的核苷三磷酸（ATP、GTP、CTP、UTP），与 DNA 分子中双链间碱基配对有所不同的是转录中由新加入的 U 与模板中的 A 配对，使 RNA 链以 5′→3′方向不断延长。随着 RNA 链的延长，核心酶前面的 DNA 链不断解旋，而核心酶后面已完成转录的区段则重新形成双螺旋。

3. 转录的终止阶段　模板 DNA 上具有特殊的转录终止序列，即终止位点，当 RNA 聚合酶移动至终止部位时，转录终止，RNA 从 DNA 模板上脱离。原核细胞中转录终止有两种形式，一种是 ρ 因子依赖性终止，即 ρ 因子在转录终止点与 RNA 聚合酶结合，使 RNA 链脱离。另一种是 ρ 因子非依赖性终止，由新合成 RNA 链形成局部发夹结构（hairpin structure），发夹结构形成可能改变了 RNA 聚合酶的构象，导致了酶-模板结合方式的改变，RNA 聚合酶则不再向下移动，磷酸二酯键停止形成，RNA 从模板脱离。

原核细胞转录形成的 mRNA 分子一般不需要加工，在合成后即可作为模板参与蛋白质的合成。而 tRNA 和 rRNA 则需要在合成初级转录产物的基础上，进一步剪切修饰才能成为具有生物功能的成熟分子。例如，rRNA 基因的初级转录产物在核酸酶的作用下，剪切成 3 种 rRNA，即 5S rRNA，16S rRNA，23S rRNA，三者比例为 1∶1∶1。

三、真核细胞的基因转录和转录后加工

真核细胞基因转录要比原核细胞复杂得多。真核细胞基因转录形成初级转录产物的基本过程与原核细胞相似，也分为转录的起始、延长和终止。但所需酶及各种蛋白因子有所不同，最为复杂的是真核细胞中转录形成的 RNA 前体分子通常需要经过复杂的加工修饰过程才能成为成熟的功能形式。

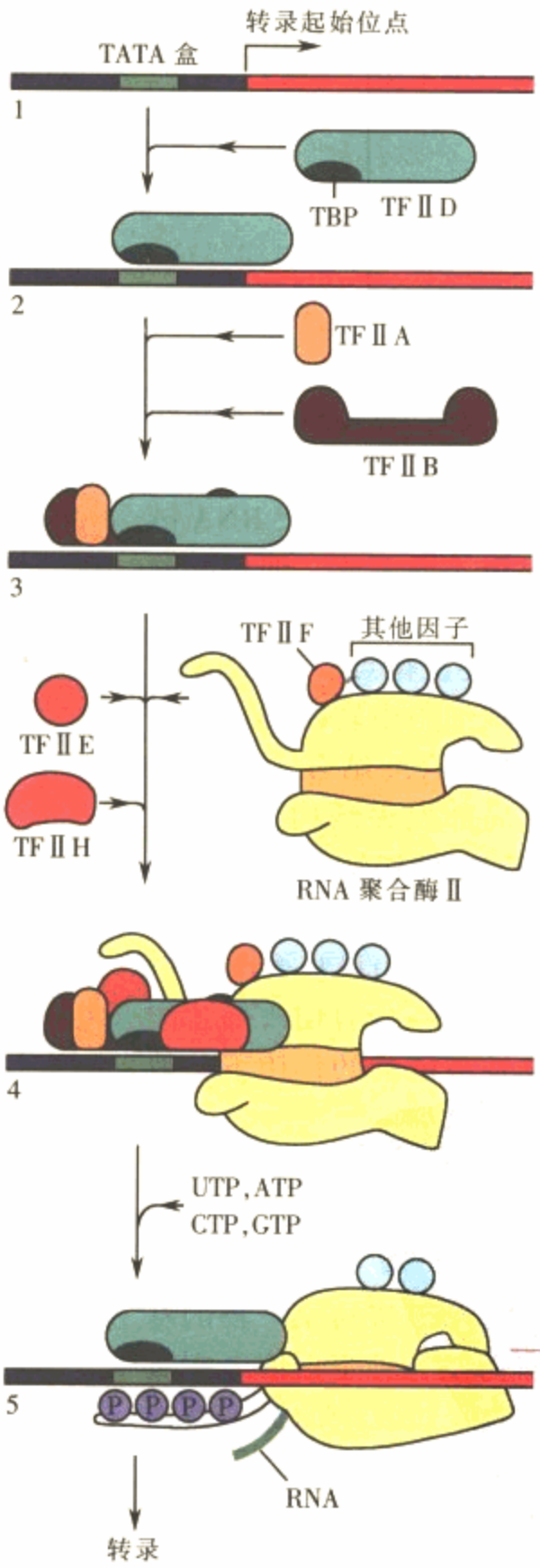
与原核细胞只有一种 RNA 聚合酶负责全部的 mRNA、rRNA、tRNA 合成不同的是，真核细胞中含有多种 RNA 聚合酶（表 9-1），它们专一性地转录不同基因而生成各不相同的产物。下面介绍各种 RNA 的合成和加工。

表 9-1　真核生物的 RNA 聚合酶

种类	细胞内定位	转录的基因
RNA 聚合酶Ⅰ	核仁	5.8S rRNA,18S rRNA 和 28S rRNA
RNA 聚合酶Ⅱ	核质	所有编码蛋白的基因,snoRNA 和某些 snRNA
RNA 聚合酶Ⅲ	核质	tRNA,5S rRNA,某些 snRNA 和其他小 RNA

（一）真核细胞 mRNA 成熟前经历首尾加工和中间剪接

1. mRNA 的初级转录本是 hnRNA　mRNA 是 RNA 中惟一具有编码蛋白质功能的 RNA 分子，其前体是编码基因在 RNA 聚合酶Ⅱ催化下转录形成的。由于 mRNA 前体分子的大小各不相同，被称为不均一核 RNA（heterogeneous nuclear RNA，hnRNA），hnRNA 需经过剪切修饰才能成为成熟的 mRNA。



●图 9-5　真核生物转录起始复合物的形成

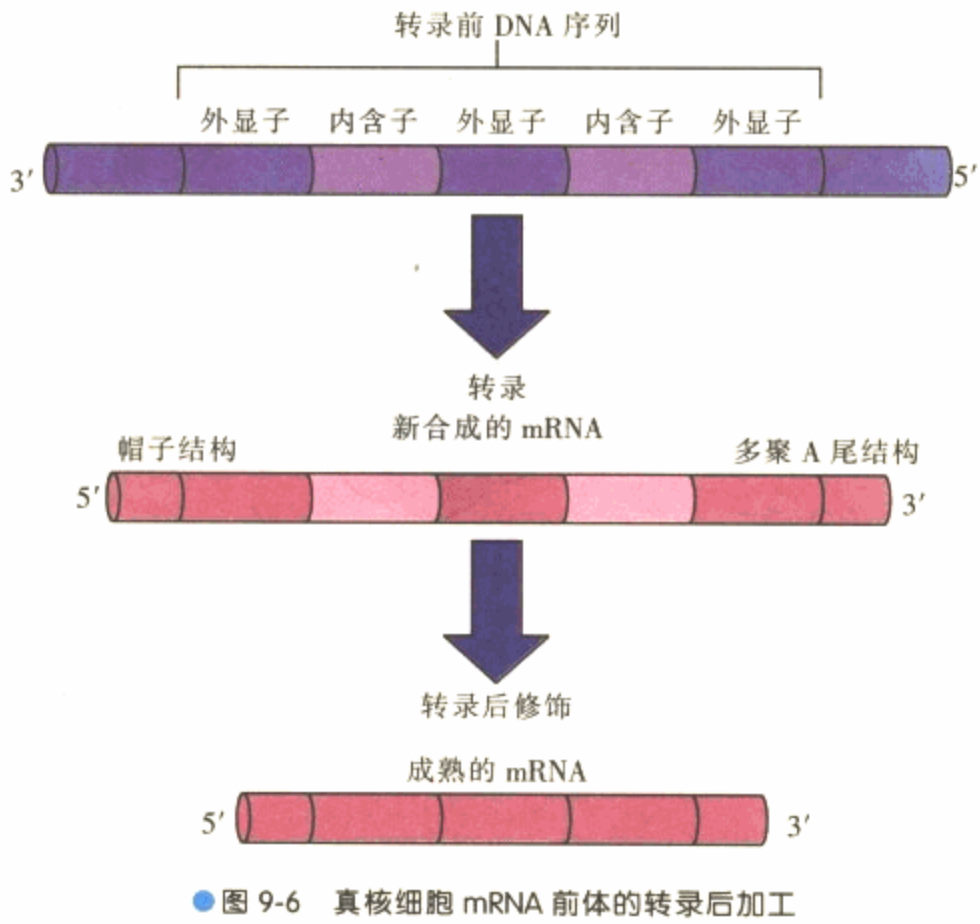
RNA 聚合酶Ⅱ起动转录时，需要一些称为转录因子（transcription factor，TF）的蛋白质参与，才能形成具有活性的转录复合物。这些参与构成 RNA 聚合酶Ⅱ转录起始复合物的转录因子通常称为通用转录因子（general transcription factor），为 RNA 聚合酶Ⅱ启动转录所必需。通用转录因子有 TFⅡA、TFⅡB、TFⅡD、TFⅡE、TFⅡF、TFⅡH，它们在真核生物进化中高度保守。

在基因转录起始的过程中，RNA 聚合酶Ⅱ的定位因子是 TFⅡD。TFⅡD 由 TATA-结合蛋白（TATA-binding protein，TBP）和 11 种 TBP 关联因子（TBP-associated factor）组成。先由 TBP 结合到启动子的 TATA 盒，然后 TFⅡB 与 TBP 结合，TFⅡB 也能与 DNA 结合。TFⅡA 虽然不是必需的，但它能稳定已与 DNA 结合的 TFⅡB-TBP 复合体，并且在TBP 与不具有特征序列的启动子结合（这种结合较弱）时发挥重要作用。TFⅡB-TBP 复合体再与由 RNA 聚合酶Ⅱ和 TFⅡF 组成的复合体结合。TFⅡF 的作用是通过和 RNA 聚合酶Ⅱ一起与 TFⅡB 相互作用，降低 RNA 聚合酶Ⅱ与 DNA 的非特异部位的结合，来协助RNA 聚合酶Ⅱ靶向结合启动子。最后是 TFⅡE 和 TFⅡH 加入，形成闭合复合体，完成转录起始复合物的装配。TFⅡH 具有解旋酶活性，能使转录起始点附近的 DNA 双螺旋解开，使闭合复合体成为开放复合体，起动转录（图 9-5）。当合成一段 60~70bp 的 RNA 后，TFⅡE 和 TFⅡH 释放，RNA 聚合酶Ⅱ进入转录延长期。一旦 RNA 合成结束，转录即终止。有关真核生物转录终止的机制目前尚不清楚。

2. 成熟的 mRNA 是 hnRNA 经过戴帽、加尾和剪接后形成的　转录形成的前体 RNA 需经过加工过程成为成熟的 mRNA，才能进入细胞质进行蛋白质合成。加工过程包括戴帽、加尾和剪接（图 9-6）。

（1）5′末端加上“帽子”结构——戴帽：戴帽（capping）是指对 hnRNA 5′端进行化学修饰，即首先在 mRNA 前体 5′端开始的第一个核苷酸上接上一个三磷酸鸟嘌呤，

然后在甲基转移酶的作用下，在鸟嘌呤第7位的氮上进行甲基化，形成一个7-甲基鸟嘌呤三磷酸（m^7Gppp）的帽子结构，同时在原来第一个核苷酸的2′-O上也进行甲基化，因此，一个帽带有二个甲基。新生的mRNA的长度达25~30bp时，就开始进行戴帽修饰。mRNA戴帽的作用一是能封闭mRNA 5′端，使其不再加接核苷酸，同时也防止转运时被核酸酶水解，增强mRNA的稳定性；二是帽子结构能被核糖体小亚基识别，有利于mRNA最初翻译的准确性。



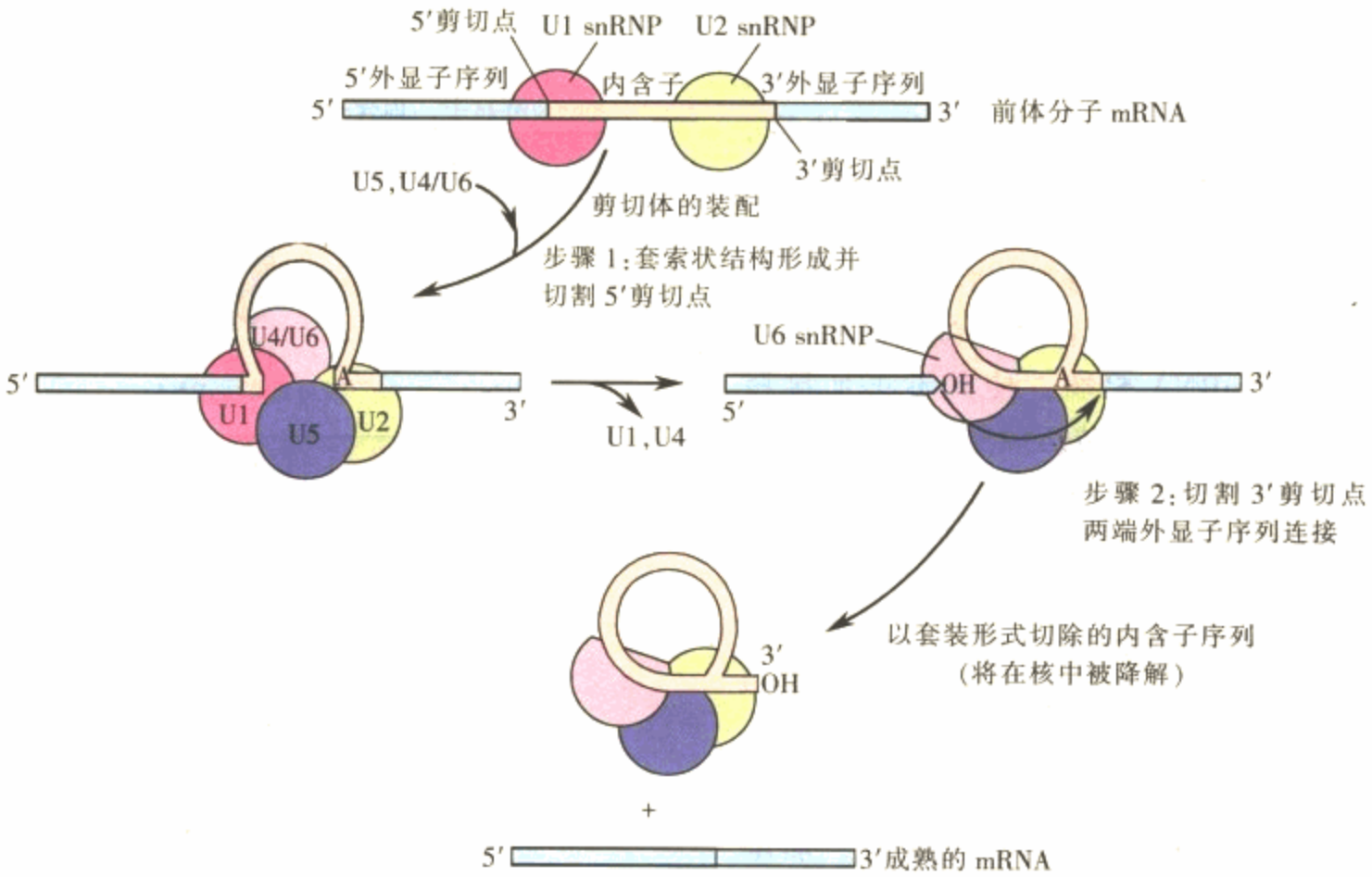
●图 9-6　真核细胞 mRNA 前体的转录后加工

（2）3′末端加上“尾”结构——加尾：加尾（tailing）是指对mRNA前体3′端的修饰过程，即在腺苷酸聚合酶的作用下，在3′端加上由200~250个腺苷酸组成的多聚腺苷酸（poly-A）的尾巴。加尾一方面可使mRNA 3′端稳定，防止被核酸酶水解，另一方面有利于mRNA由核到细胞质的转运。

目前发现，决定mRNA前体分子加尾的信号序列存在于mRNA 3′端，即在发生多聚腺苷酸化位点的上游10~30bp处存在一高度保守的6核苷酸序列（在哺乳动物中为AAUAAA），在多聚腺苷酸化位点的下游常存在富含G和U的序列。这些序列可被含有腺苷酸聚合酶的复合物所识别，进行加尾。

（3）剪接：基因转录过程是以一段连续的DNA序列为模板进行的，在初级转录产物中包含有内含子和外显子序列，在形成成熟mRNA过程中，需将hnRNA中的内含子切除，形成由连续编码序列组成的mRNA模板。剪接（splicing）即是将RNA前体分子中内含子切除，将外显子拼接的过程。对真核生物外显子与内含子相邻序列研究发现，初级转录产物中的内含子常以GU开始，以AG结束，被认为是真核生物基因特有的剪接信号，也称剪接点。几乎所有真核生物基因的内含子均遵循这一GU-AG规则，表明这类内含子存在着共同的剪接机制。完成hnRNA剪接需要有三个必需的序列：5′GU序列，3′AG序列和分支点（branch site）。分支点位于内含子3′端上游约30个碱基处，为一高度保守的A，在3′剪接位点的识别中起重要作用。点突变研究表明，剪接点GU或AG的突变可以阻止剪接的出现。例如，人类的β-珠蛋白生成障碍性贫血可能就是由于β-珠蛋白的hnRNA的内含子剪切点顺序发生改变，不能形成成熟的β珠蛋白mRNA，因而不能合成正常的血红蛋白，从而导致疾病。

mRNA前体的剪接是通过剪接体（spliceosome）完成的。剪接体大小为60S，由数种小分子细胞核糖核蛋白颗粒（small nuclear ribonucleoprotein particle，snRNP）组成。snRNP由细胞核中存在的一类小核RNA（small nuclear RNA，snRNA）和一些蛋白质组成，常见的snRNA有U1、U2、U4、U5和U6，除U6 snRNA由RNA聚合酶Ⅲ转录外，其他snRNA均由RNA聚合酶Ⅱ催化合成。剪接过程见图9-7，首先U1 snRNP结合到具有5′帽结构的hnRNA内含子5′剪接点，随后U2 snRNP结合到内含子分支点，这一过程需要ATP供能。接着，U4、U5、U6 snRNP以复合体的形式与先期已经结合于mRNA前体分子的U1、U2装配成无活性的剪接体；再通过内部的重排，U1、U4被排出剪接体，



●图 9-7　真核细胞 mRNA 前体的剪接过程

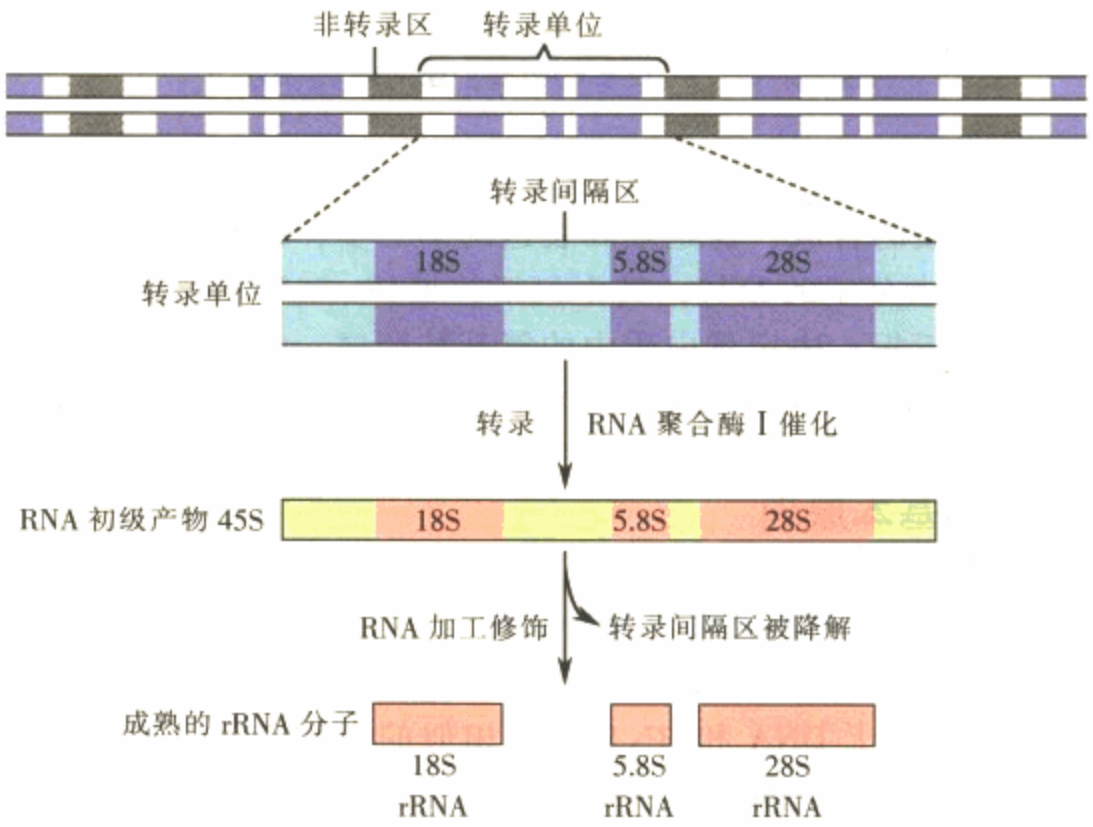
从而使无活性的剪接体转变为有活性的剪接体。此后，发生两步反应，第一步，分支点上的核苷酸 A 接近 5′剪接点，内含子与 5′外显子被从此处断开，切断的内含子 5′端与核苷酸 A 共价连接形成套索状（lariat）结构。第二步，5′外显子上的 3′-OH 端与 3′外显子的起始部位结合，并切割 3′剪接点，3′和 5′端外显子彼此连接，剪接体各组分和套索状结构脱离，剪接完成。

（二）核仁 DNA 编码的 rRNA 分子都来源于一个前体分子的合成后加工

真核细胞中的 rRNA 基因串联排列于特定的核仁染色质区段，为多拷贝基因，人体每个单倍体基因组上包含有 200 个 rRNA 基因拷贝，每个基因之间由不转录的间隔 DNA 分隔，这种间隔长度在不同种属生物间差别较大。每个基因由 3 个外显子和 2 个内含子组成，3 个外显子依次为编码 18S rRNA、5.8S rRNA、28S rRNA 的前体序列，共同组成一个转录单位。在 RNA 聚合酶Ⅰ催化下转录形成原始 rRNA 前体——45S rRNA，最终剪切为 28S、18S 和 5.8S rRNA。

在所有真核生物中，rRNA 初级转录产物的长度要比成熟 rRNA 长得多，在人类细胞中，只有一半初级转录产物中的序列出现在成熟的 rRNA 分子中，这提示某些序列经加工去除。rRNA 前体的加工发生在核仁中，最终装配成核糖体的大、小亚基。首先一些核糖体蛋白与 rRNA 前体分子结合，这种结合在 rRNA 前体转录完成前即已发生。随后，45S rRNA 裂解为 41S，并形成 32S 和 20S 的中间产物，20S 中间产物很快继续裂解为 18S rRNA，连同结合的核糖体蛋白，以 40S 核糖体小亚基形式释放至细胞质中。因而，核糖体小亚基在胞质中的出现要早于大亚基。32S 中间产物保留在核仁的颗粒成分中，并被剪切为 28S 和 5.8S rRNA，最后与核糖体蛋白组成 60S 的核糖体大亚基释放至胞质中（图 9-8）。rRNA 前体的另一种加工形式是甲基化，主要发生在核糖的 2′-羟基，一般认为，这种化学修饰有利于前体 rRNA 的有效裂解。

rRNA 的剪接不需要任何蛋白质的参与即可发生，进行的是自身剪接。1982 年 T. Cech 等发现在四膜虫细胞的 rRNA 剪接过程中，前体 rRNA 释放出一种能催化寡核苷酸底



●图 9-8　45S rRNA 的剪接加工

物剪接的短链 RNA（L19RNA），即为一种具有酶活性的核酶（ribozyme）。

（三）新合成的 tRNA 只有经过加工修饰后才能成为有活性的分子

tRNA 是一类小分子量的 RNA 分子，真核细胞中有 50~60 种。它们能够识别 mRNA 中的密码子并携带由密码子所指定的氨基酸进行蛋白质的合成。在真核细胞中含有多个编码 tRNA 的基因，人体细胞中有 1 300 个拷贝，成簇存在并被间隔区分开，在 RNA 聚合酶Ⅲ的作用下被转录为 tRNA 前体。tRNA 前体基因转录需要两种转录因子，TFⅢB 和 TFⅢC，它们可与 tRNA 基因转录起始点下游+10~+60 中的两个特殊区段结合形成复合物，该复合物与 RNA 聚合酶Ⅲ结合，起动 tRNA 基因的转录。

真核生物 tRNA 前体约为 100 个核苷酸长度，这种新转录生成的 tRNA 前体一般无生物活性，需要进行剪接和碱基修饰才能形成成熟的 tRNA。

（1）tRNA 前体的剪接：由真核细胞 RNA 聚合酶Ⅲ催化产生的 tRNA 前体，在 RNA 酶作用下，tRNA 前体的 5′末端和相当于反密码环的区域分别被切除一定长度的多核苷酸链，再由连接酶催化而拼接形成成熟的 tRNA。

（2）tRNA 前体的化学修饰：成熟的 tRNA 分子中有许多的稀有碱基（rare base），这些稀有碱基常通过化学修饰而成，这些化学反应包括：①甲基化反应，tRNA 在甲基转移酶催化下，某些嘌呤生成甲基嘌呤如 A→A^m，G→G^m；②还原反应，尿嘧啶还原为双氢尿嘧啶；③核苷内的转位反应，尿嘧啶核苷转变为假尿嘧啶核苷；④脱氨基反应，部分腺苷酸脱氨基成为次黄嘌呤核苷酸。

（3）3′末端加上 CCA：在核苷酸转移酶的作用下，3′末端除去个别碱基后，换上 tRNA 分子统一的CCA-OH 末端，完成 tRNA 分子中的氨基酸臂结构。

原核生物 tRNA 成熟的机制与真核生物相同。

（四）5S rRNA 由核仁外基因编码

5S rRNA 是一类特殊的 rRNA 分子。与其他类型的 rRNA 分子不同，5S rRNA 是由核仁外的基因编码，5S rDNA 为串联排列的多拷贝基因，在 RNA 聚合酶Ⅲ的作用下，5S rDNA 转录为 5S rRNA。由于在 5S rDNA 中无内含子存在，所以，由 5S rDNA 转录形成的5S rRNA 无需进一步的剪切加工，即可转运至核仁中，直接参与核糖体大亚基的组装。

第三节　蛋白质的生物合成

在遗传信息的传递过程中，DNA 将其遗传信息转录给 mRNA，这是基因表达的第一步，mRNA 再指导蛋白质的合成，这是基因表达的第二步，即翻译（translation）。在翻译过程需要 300 多种生物大分子的参与，其中包括核糖体、mRNA、tRNA 及多种蛋白质因子。mRNA 作为翻译的模板，决定蛋白质中的氨基酸顺序；tRNA 作为运输工具，携带氨基酸准确进入指定位置；rRNA 与多种蛋白质组成核糖体，作为蛋白质合成的装配机器。

一、遗传信息翻译的基本原理

（一）mRNA 携带指导蛋白质合成的遗传密码

生物体的遗传信息储存于 DNA 分子四种碱基的排列顺序中，通过转录，这种顺序转移到 mRNA 分子中。由于 DNA 和 RNA 具有相似的结构特点，因而在转录中可通过碱基互补配对的形式实现信息的传递。但 RNA 和蛋白质的结构不同，而且组成蛋白质的氨基酸有 20 种，组成 RNA 的碱基只有 4 种，无法实现相互之间的一一对应。那么 RNA 与蛋白质间的信息传递是以什么方式进行的呢？现在人们认识到，在 mRNA 链上 3 个相邻的碱基可以决定一个特定的氨基酸，这种核苷酸三联体因此被称为密码子（codon）。除了 5′端和 3′端的非翻译区之外，整个 mRNA 链即是由串联排列的密码子组成，这样，就把 mRNA 上的碱基排列顺序叫做遗传密码（genetic code）。在蛋白质合成中，它们决定氨基酸的排列顺序。核苷酸有 4 种，每 3 个为一组，共可组成 64 种密码子（表 9-2）。

遗传密码有如下特点：①通用性（universal）：从原核生物到真核生物，几乎所有生物体中的遗传密码都是通用的，就是说，一个特定的碱基序列无论在哪一种生物体中均编码同一种氨基酸。但也有例外，动物细胞线粒体和植物细胞叶绿体中，蛋白质合成所使用的三联密码子有少数与目前通用密码子有所不同（详见第六章）。②简并性（degen-

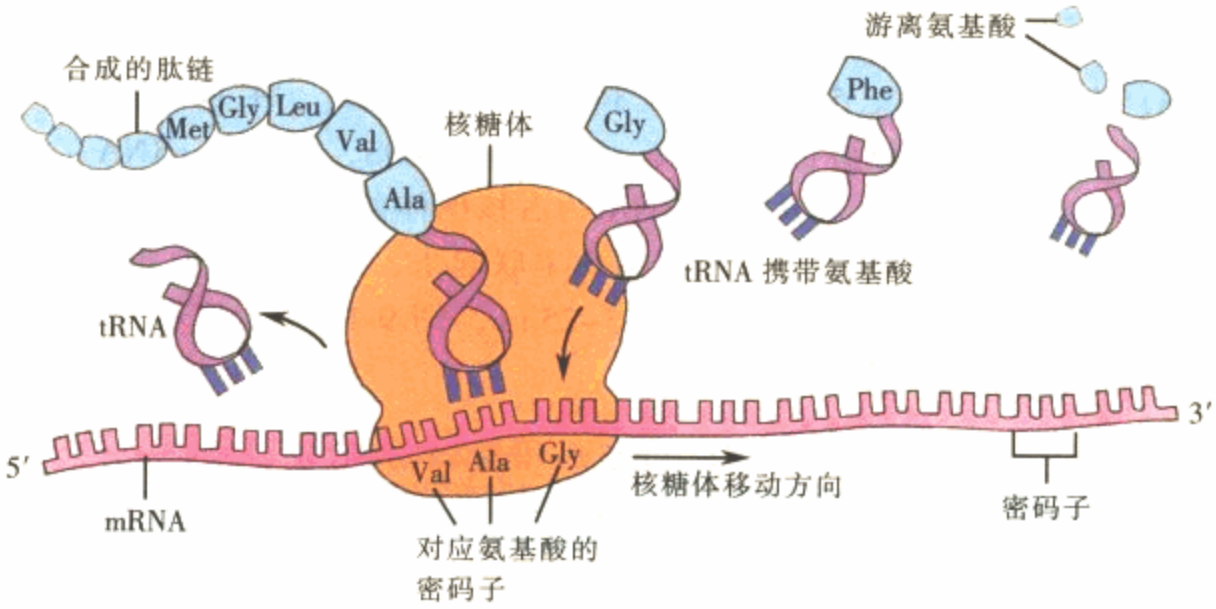
表 9-2　遗传密码表

第一碱基（5′端）	第二碱基				第三碱基（3′端）
	U	C	A	G	
U	UUU 苯丙氨酸	UCU 丝氨酸	UAU 酪氨酸	UGU 半胱氨酸	U
	UUC 苯丙氨酸	UCC 丝氨酸	UAC 酪氨酸	UGC 半胱氨酸	C
	UUA 亮氨酸	UCA 丝氨酸	UAA 终止	UGA 终止	A
	UUG 亮氨酸	UCG 丝氨酸	UAG 终止	UGG 色氨酸	G
C	CUU 亮氨酸	CCU 脯氨酸	CAU 组氨酸	CGU 精氨酸	U
	CUC 亮氨酸	CCC 脯氨酸	CAC 组氨酸	CGC 精氨酸	C
	CUA 亮氨酸	CCA 脯氨酸	CAA 谷氨酰胺	CGA 精氨酸	A
	CUG 亮氨酸	CCG 脯氨酸	CAG 谷氨酰胺	CGG 精氨酸	G
A	AUU 异亮氨酸	ACU 苏氨酸	AAU 门冬酰胺	AGU 丝氨酸	U
	AUC 异亮氨酸	ACC 苏氨酸	AAC 门冬酰胺	AGC 丝氨酸	C
	AUA 异亮氨酸	ACA 苏氨酸	AAA 赖氨酸	AGA 精氨酸	A
	AUG 甲硫氨酸	ACG 苏氨酸	AAG 赖氨酸	AGG 精氨酸	G
G	GUU 缬氨酸	GCU 丙氨酸	GAU 门冬氨酸	GGU 甘氨酸	U
	GUC 缬氨酸	GCC 丙氨酸	GAC 门冬氨酸	GGC 甘氨酸	C
	GUA 缬氨酸	GCA 丙氨酸	GAA 谷氨酸	GGA 甘氨酸	A
	GUG 缬氨酸	GCG 丙氨酸	GAG 谷氨酸	GGG 甘氨酸	G

eracy)：密码子有 64 种，其中三个密码子 UAA、UAG、UGA 为终止密码，不决定氨基酸，其余 61 个密码子都可以编码氨基酸，而氨基酸只有 20 种，所以，必然出现多个密码子决定同一氨基酸的情况，这种现象叫做遗传密码的简并性。如丙氨酸由 GCU、GCC、GCA、GCG 4 种密码子决定，而亮氨酸则由 6 种密码子决定。③连续性（commaless)：在翻译过程中，遗传密码的阅读是连续的，在 mRNA 上的每个三联体密码子之间没有间隔。④方向性（direction)：mRNA 中每个密码子的阅读方向必须从 5′→3′，因而起始密码子 AUG 总是位于5′端，终止密码子则位于 3′端，翻译过程是从 mRNA 的 5′→3′方向进行。

（二）tRNA 既能识别 mRNA 上的密码子又能携带特定的氨基酸

在翻译过程中，mRNA 上的碱基序列可以决定蛋白质中的氨基酸序列，但在 mRNA 碱基与氨基酸之间不具有特异的化学识别作用，两者之间的相互作用是通过另一类核酸分子 tRNA 实现的。tRNA 既能够识别 mRNA 上的密码子，又能携带特定的氨基酸，因而被称为蛋白质合成的接合器（adaptor）（图 9-9)。



●图 9-9　tRNA 转运氨基酸机制示意图

tRNA 结构的主要特点是 3′端的 CCA 序列，活化后的氨基酸就是通过 CCA 序列上的-OH 与 tRNA 结合，然后被带到核糖体上参与蛋白质的合成。tRNA 携带特定氨基酸的过程是通过氨酰-tRNA 合成酶催化的两步反应完成的，反应的第一步是氨基酸与 ATP 在氨酰-tRNA 合成酶作用下形成氨酰-AMP，完成氨基酸的活化；第二步，活化氨基酸的氨酰基被转移至 tRNA 分子上形成氨酰-tRNA（aminoacyl-tRNA）并释放 AMP，完成氨基酸与 tRNA 的连接。

tRNA 的另一个重要的结构部位是位于反密码环中的一个三联核苷酸，在蛋白质合成中能通过碱基互补配对识别 mRNA 上的密码子，这种存在于 tRNA 中的三联核苷酸被称为反密码子（anticodon)。不同的 tRNA 分子有不同的反密码子。

在翻译过程中，tRNA 携带特定的氨基酸，通过反密码子识别 mRNA 上的密码子，实现遗传信息从 mRNA 到蛋白质的传递，因此，密码子与反密码子之间的正确识别是遗传信息正确传递的保证。在生物体中，tRNA 的种类要小于编码氨基酸的密码子的种类，要识别这些密码子，必然存在一种反密码子识别多种密码子的现象。一般来讲，密码子的前两位碱基在和反密码子配对时，遵循正常的碱基互补配对原则，而第三位碱基的配对具有一定的灵活性，即反密码子的第三个碱基（5′碱基）可与密码子第三位上的不同碱基配对，这就是密码子和反密码子配对的摆动性（wobble)。例如，携带丙氨酸

的 tRNA 反密码子为 3′-CGC -5′，它既可以和密码子 5′-GCG -3′配对，也可以和 5′-GCU-3′配对。

二、蛋白质合成的场所——核糖体

核糖体（ribosome）也称核蛋白体。核糖体几乎存在于所有的细胞内，即使是最简单的支原体细胞也至少含有上百个核糖体。此外，在线粒体中也含有核糖体。核糖体是合成蛋白质的机器，其功能是按照 mRNA 的指令由氨基酸合成蛋白质。

（一）核糖体是由 rRNA 和蛋白质组成的大分子复合物

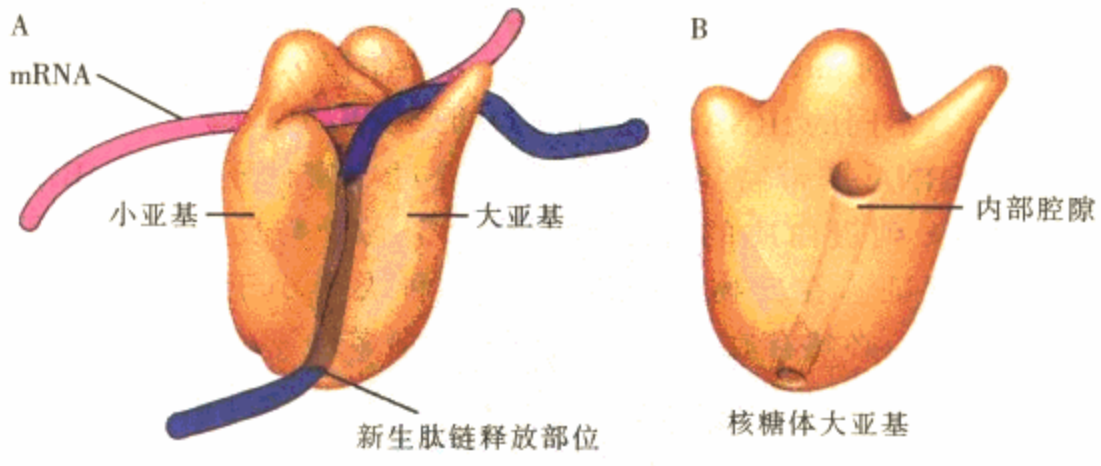
生物体内含有两种基本类型的核糖体，一是 70S 的核糖体，存在于原核细胞；另一类是 80S 的核糖体，存在于真核细胞。此外，真核细胞线粒体内的核糖体近于 70S。70S 和 80S 的核糖体均由大小不同的两个亚单位组成，大的称为大亚基，小的称为小亚基。核糖体大小亚基在细胞内一般以游离状态存在，只有当小亚基与 mRNA 结合后，大亚基才与小亚基结合，形成完整的核糖体。

分析结果显示：在 70S 核糖体中，小亚基为 30S，由 16S rRNA 和 21 种蛋白质组成，大亚基为 50S，由 23S rRNA、5S rRNA 和 34 种蛋白质组成。在 80S 核糖体中，小亚基为40S，由 18S rRNA 和 33 种蛋白质组成，大亚基为 60S，由 28S rRNA、5.8S rRNA 和 5S rRNA 及 49 种蛋白质组成（表 9-3）。RNA 约占核糖体的 60%，蛋白质约占 40%。核糖体中的 RNA 主要构成核糖体的骨架，将蛋白质串联起来，并决定蛋白质的定位。

电镜下，核糖体呈颗粒状，直径约为 15~25nm，图 9-10 显示了根据电镜负染色结果所绘制的核糖体立体结构模型。

表 9-3　原核细胞与真核细胞核糖体成分的比较

	原核生物	真核生物
完整核糖体	70S	80S
核糖体大亚基	50S	60S
组成大亚基的 rRNA	23S，含 2 900 个核苷酸	28S，含 4 700 个核苷酸
	5S，含 120 个核苷酸	5.8S，含 160 个核苷酸
		5S，含 120 个核苷酸
组成大亚基的蛋白质	34 种	约 49 种
核糖体小亚基	30S	40S
组成小亚基的 rRNA	16S，含 1 540 个核苷酸	18S，含 1 900 个核苷酸
组成小亚基的蛋白质	21 种	约 33 种



●图 9-10　核糖体立体结构模型

（二）核糖体是蛋白质合成的场所

在原核细胞中，除少数核糖体附着在质膜以外，大部分核糖体则以游离形式存在。在真核细胞中，很多核糖体附着在内质网膜的外表面，形成粗面内质网，还有一部分核糖体以游离形式分布在细胞质溶胶内。呈游离状态的核糖体称为游离核糖体，附着在膜上的核糖体称为附着核糖体，两者的结构与功能基本相同，其不同点在于所合成的蛋白质种类不同，如游离核糖体主要合成细胞内的某些基础性蛋白，附着核糖体主要合成细胞的分泌蛋白和膜蛋白。

核糖体上存在多个与蛋白质的多肽链形成密切相关的活性部位（图 9-11），主要有：

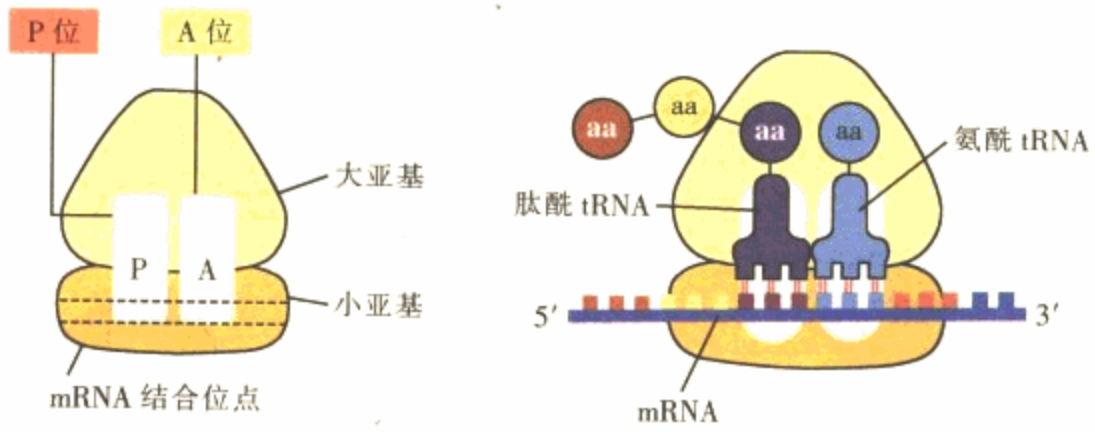
1. mRNA 结合位点　原核生物 30S 小亚基具有专一性的识别和选择 mRNA 起始位点的性质。研究发现，30S 小亚基通过其 16S rRNA 的 3′端与 mRNA 5′端起始密码子上游碱基配对结合。在原核生物的 mRNA 5′端起始密码子的上游都有一个 SD 序列（Shine-Dalgarno sequence），即 5′-AGGAGGU-3′序列，这个富嘌呤区与 30S 小亚基上 16S rRNA 3′端的富嘧啶区序列 5′-CACCUCCUUA-3′互补。SD 序列可指导 mRNA 的起始密码子正确定位在 30S 小亚基的 P 位点，又称为核糖体结合位点（ribosomal binding site，RBS）。在真核生物中，核糖体上有专一位点或因子识别 mRNA 的帽子结构，使 mRNA 与核糖体结合。

2. P 位点　P 位点（peptidyl site）是肽酰 tRNA 结合的位置。它大部分位于小亚基，小部分位于大亚基，是结合起始肽酰-tRNA 并向 A 位给出氨基酸的位置。

3. A 位点　A 位点（aminoacyl site）是氨酰 tRNA 结合的位置。它大部分位于大亚基而小部分位于小亚基，是结合一个新进入的氨酰 tRNA 的位置。

4. 转肽酶活性部位　转肽酶（transpeptidase）活性部位位于 P 位和 A 位的连接处，其作用是在肽链延长时，催化进入核糖体的氨基酸之间形成肽键。

5. 参与蛋白质合成的因子的结合部位　如结合起始因子（initiation factor，IF）、延长因子（elongation factor，EF）和终止因子或释放因子（release factor，RF）的部位。



●图 9-11　核糖体上的主要功能位点

三、蛋白质合成的一般过程

蛋白质生物合成可分为五个阶段，即氨基酸的活化、多肽链合成的起始、肽链的延长、肽链的终止和释放、蛋白质合成后的加工修饰。原核生物与真核生物的蛋白质合成过程中有很多区别，真核生物此过程比较复杂，下面着重介绍原核生物蛋白质合成的过程，并指出真核生物与其不同之处。

（一）氨基酸活化是蛋白质生物合成的预备阶段

氨基酸在参与合成肽链以前需活化以获得额外的能量。在氨酰-tRNA 合成酶作用下，氨基酸的羧基与 tRNA 3′末端的 CCA-OH 缩合成氨酰-tRNA。该反应是耗能过程，生成的

氨酰-tRNA 中酯酰键含较高能量，可用于肽键合成。其总反应式可写为：

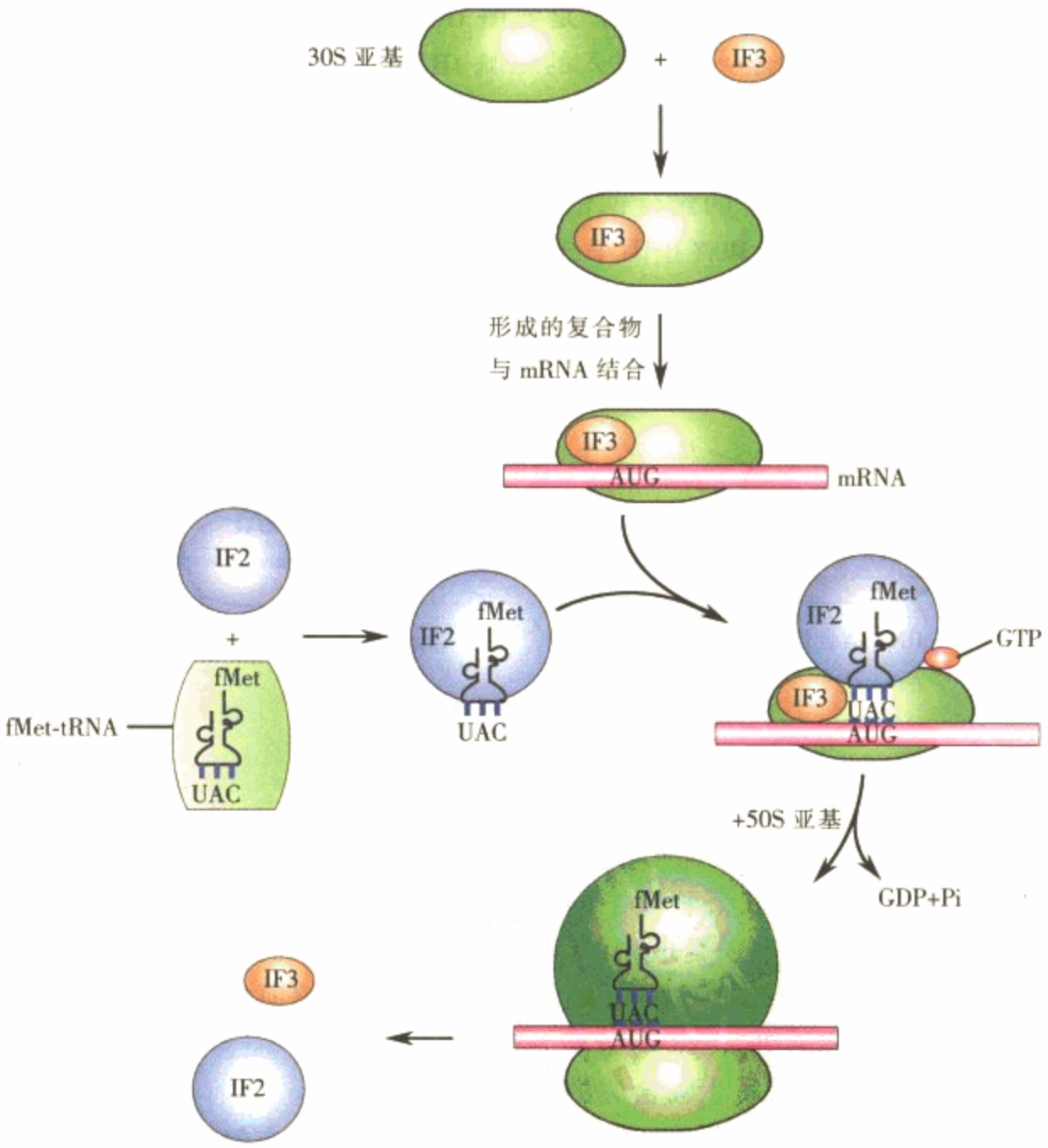
氨基酸+tRNA+ATP→氨酰 tRNA+AMP+PPi

氨酰-tRNA 合成酶分布在细胞浆中，其作用具有高度特异性，它既能识别特异的氨基酸，又能辨认携带该种氨基酸的特异 tRNA，这是保证遗传信息准确翻译的关键之一。

（二）起始复合物是翻译起始阶段的“蛋白质装配机”

起始阶段指核糖体大、小亚基，mRNA 和具有启动作用的起始氨酰-tRNA 装配为起始复合物的过程。具有启动作用的氨酰-tRNA 在原核细胞是甲酰甲硫氨酰-tRNA（fMet-$tRNA^{fMet}$），在真核细胞是甲硫氨酰-tRNA（Met-$tRNA^{Met}$）。

在大肠杆菌中翻译起始复合物形成的过程：①在起始因子-3（IF-3）介导下，核糖体 30S 小亚基附着于 mRNA 起始信号部位（SD 序列），形成 IF3-30S 亚基-mRNA 三元复合物；②在起始因子-2 作用下，fMet-$tRNA^{fMet}$ 与 mRNA 分子中的 AUG 相结合（密码子与反密码子配对），同时 IF-3 从三元复合物中脱落，形成 30S 前起始复合物，即 IF2-30S 亚基-mRNA-fMet-$tRNA^{fMet}$ 复合物，此步需要 GTP 和 Mg^{2+} 参与；③50S 亚基与上述的 30S 前起始复合物结合，同时 IF-2 脱落，形成 70S 起始复合物，即 30S 亚基-mRNA-50S 亚基-mRNA-fMet-$tRNA^{fMet}$ 复合物。此时 fMet-$tRNA^{fMet}$ 占据着 50S 亚基的肽酰位（P 位点），而 A 位点则空着有待于对应 mRNA 中第二个密码的相应氨酰-tRNA 进入，从而进入延长阶段（图 9-12）。



●图 9-12　大肠杆菌中翻译起始复合物的形成

与原核细胞相比，真核细胞蛋白质合成起始过程更为复杂。参与该过程的起始因子被称为 eIF（e 代表真核细胞）。某些 eIF 参与了 40S 小亚基与 mRNA 5′端帽子结构的结合。在起始复合物形成后，40S 小亚基在 mRNA 上扫描直到发现正确的 AUG 起始密码子，然后 eIF 被释放，60S 大亚基结合到起始复合物上来，启动蛋白质的合成。此外，mRNA 3′端尾部的 poly-A 可以促进起始复合物的形成，提高翻译效率。

（三）肽链延长是多因子参与的核糖体循环过程

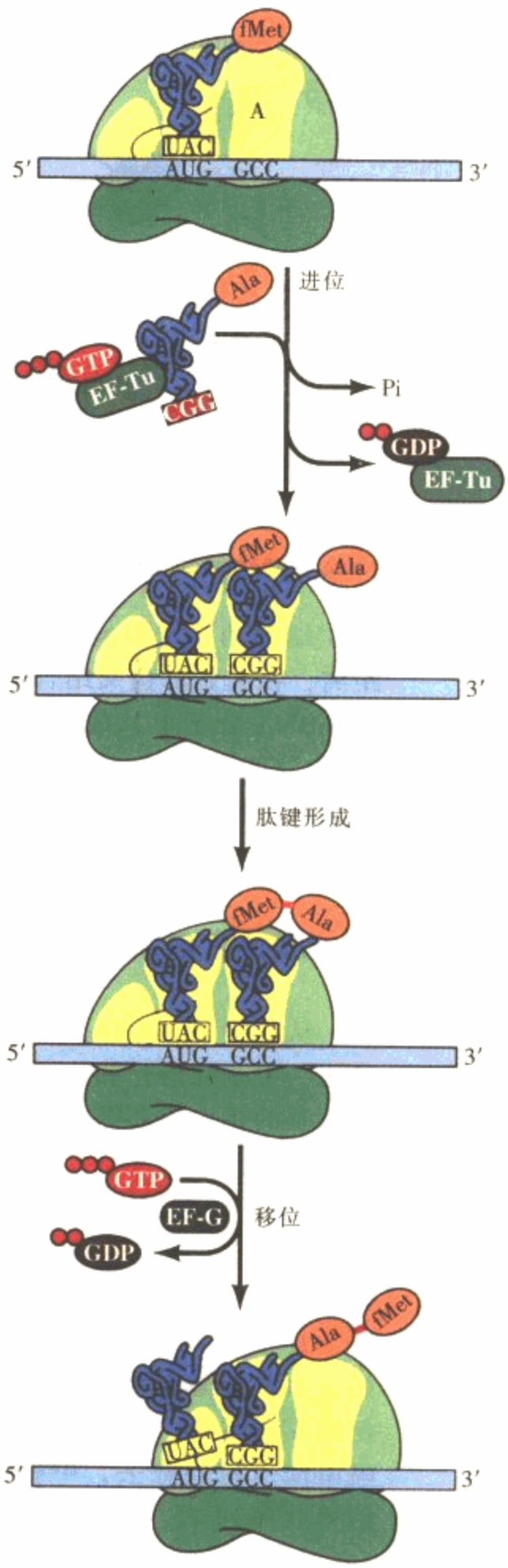
起始复合物形成后，根据 mRNA 上密码子序列的指导，各种氨酰-tRNA 依次结合到核糖体上使肽链从 N 端向 C 端逐渐延长。由于肽链延长在核糖体上连续循环进行，所以这个过程又称为核糖体循环（ribosome circulation），每经过一个循环肽链增加一个氨基酸。核糖体循环包括进位（registration）、成肽（peptide bond formation）、移位（translocation）三个步骤（图 9-13）。

1. 进位　根据 70S 起始复合物 A 位点上 mRNA 密码子，特异的氨酰-tRNA 进入 A 位点。此步骤需 GTP、Mg^{2+}和延长因子 EF-Tu 与 EF-Ts。EF-Tu 和 EF-Ts 是 EF-T 的两个亚基。EF-Tu 与 GTP、氨酰-tRNA 反应生成三元复合物——氨酰-tRNA-EF-Tu-GTP。该复合物中 tRNA 的反密码子与小亚基上 mRNA 结合后，其中的 GTP 分解释放 Pi，EF-Tu-GDP 脱落并与 EF-Ts 反应生成 GDP 和 EF-Tu-EF-Ts，后者再与 GTP 反应，释放出 EF-Ts 生成EF-Tu-GTP 并进入下一次延长反应。

2. 成肽　在起始复合物形成后，核糖体的 P 位点上已结合了起始型 fMet-$tRNA^{fMet}$，在进位后，P 位点和 A 位点上各结合了一个氨酰 tRNA，两个氨基酸之间在核糖体大亚基转肽酶的作用下，P 位上的氨基酸提供 α-COOH 基，与 A 位上的氨基酸的 α-NH_2 基形成肽键，从而使 P 位上的氨基酸连接到 A 位氨基酸的氨基上，这就是成肽。成肽后，在 A 位上形成了一个二肽酰 tRNA。P 位上的 tRNA 随之从核糖体上脱落下来，使 P 位空出。

3. 移位　P 位空出后，在延长因子 G（EF-G）的作用下，由 GTP 供能，核糖体沿 mRNA5′端向 3′端移动一个密码子距离，结果使肽酰 tRNA 由 A 位移到 P 位，空出的 A 位可接受新的氨酰-tRNA。此后，肽链上每增加一个氨基酸残基，即重复上述进位、成肽、移位的步骤，直至所需的长度。

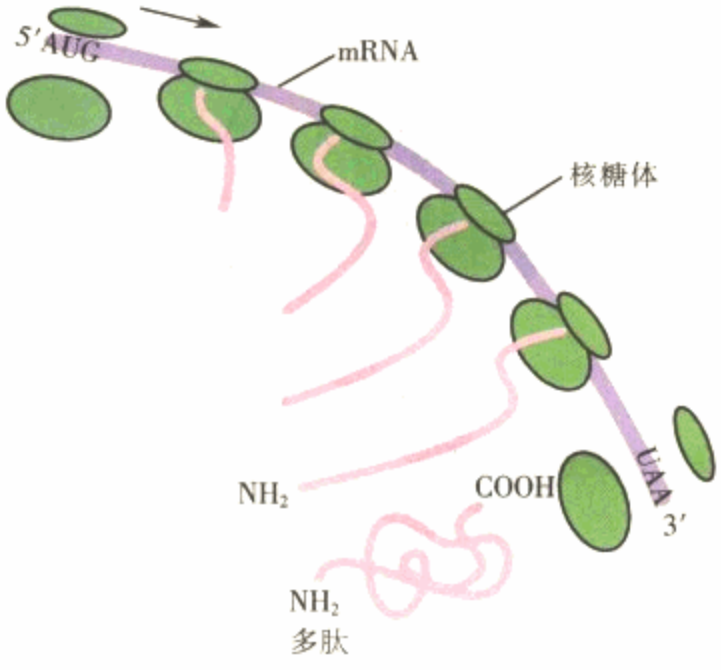
真核细胞的肽链延长过程与原核细胞大致相同，仅在参与的因子方面有所区别。如真核细胞的延长因子有 3 种，分别为 eEF1α、eEF1βγ 和 eEF2；移位时所需因子为 eEF-2。



●图 9-13　核糖体循环

（四）肽链合成终止过程包括三个步骤

在核糖体向 mRNA 3′端移动中，肽链也逐渐延长，当 mRNA 的终止信号 UAA、UAG、UGA 中任一种进入 A 位时，没有任何 tRNA 能与之识别，只有释放因子（RF）识别这种信号。原核细胞的 RF 有 3 种，RF-1 识别 UAA 和 UAG，RF-2 识别 UAA 和 UGA，RF-3 结合 GTP 并促进 RF-1、RF-2 与核糖体结合。终止的过程如下：



●图 9-14　多聚核糖体与蛋白质合成

1. 终止密码的辨认　当 A 位上出现终止密码时，RF-1 或 RF-2 识别并结合到 A 位上。

2. 肽链和 mRNA 等释出　RF 的结合使核糖体上转肽酶构象改变，具有水解酶活性，使 P 位上 tRNA 与肽链间酯键水解，肽链脱落。tRNA、RF、mRNA 也随后从核糖体上释出。

3. 核糖体大小亚基解聚　在 IF-3 作用下，大小亚基解聚，重新进入新循环。

真核细胞终止过程与原核细胞相似，但其释放因子为 eRF1，它可识别 3 种终止密码子。

在生物细胞内进行蛋白质合成时，每分子 mRNA 上不只结合一个核糖体，而是同时结合着多个核糖体。蛋白质开始合成时，第一个核糖体在 mRNA 的起始部位结合，引入第一个甲硫氨酸，接着核糖体向 mRNA 的 3′端移动一定距离后，第二个核糖体又在 mRNA 的起始部位结合，并向前移动一定的距离，在起始部位又结合第三个核糖体，依次下去直至终止。这样，多个核糖体结合到一个 mRNA 分子上，成串排列，形成蛋白质合成的功能单位，称为多聚核糖体（polyribosome）（图 9-14）。两个核糖体之间有一定的长度间隔，每个核糖体都独立完成一条多肽链的合成，所以这种多聚核糖体可以在一条 mRNA 链上同时合成多条相同的多肽链，这就大大提高了翻译的效率。

四、肽链合成后的加工修饰

从核糖体 mRNA 链释放的新生多肽链尚不具有生物活性，必需经过化学修饰（如糖基化、甲基化等）和加工处理，使其在一级结构的基础上进一步盘曲、折叠，对于含有多个亚基的蛋白质还需要亚基与亚基间的结合，这样才能形成具有天然构象和生物学活性的功能蛋白。

（一）一级结构的修饰改变了多肽链氨基酸的性质和组成

新生多肽链一级结构的修饰常通过化学反应进行，如磷酸化、甲基化、二硫键形成等，这往往能改变多肽链氨基酸的性质和组成，并为空间结构的形成提供基础。

1. 肽链氨基端的修饰　原核生物中几乎所有蛋白质合成都是从 N-甲酰甲硫氨酸开始，真核生物从甲硫氨酸开始，但天然蛋白质大多数不是以甲硫氨酸或甲酰甲硫氨酸为氨基端起始的。因此，在多肽链合成终止，甚至在肽链合成进行的同时，甲酰基经脱甲酰基酶水解而除去，甲硫氨酸或者氨基端的一些氨基酸残基由氨肽酶水解掉，包括除去信号肽序列。

2. 共价修饰　许多蛋白质可以进行不同类型化学基团的共价修饰，如磷酸化、糖基化、羟基化、甲基化、乙酰化和二硫键形成等，修饰后可以表现为激活状态，也可表现为失活状态。

磷酸化多发生在多肽链丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基上，由蛋白激酶催化，磷酸化后蛋白质的活性发生改变，如磷酸化酶经磷酸化后活性增加，而糖原合成酶经磷酸化后活性丧失；质膜蛋白质和许多分泌型蛋白质都具有糖链，这些寡糖链通过糖基化反应结合在丝氨酸或苏氨酸的羟基上，如红细胞膜上的 ABO 血型决定簇；胶原蛋白前体脯氨酸和赖氨酸残基羟基化形成羟脯氨酸和羟赖氨酸，对成熟胶原的链间共价交联是必需的；mRNA 上

没有胱氨酸的密码子，多肽链中的二硫键，是在肽链合成后，通过两个半胱氨酸的巯基氧化形成的，二硫键的形成对维持蛋白质的活性和结构是必需的。

3. 多肽链的水解修饰　有些活性蛋白往往是由其无活性的前体蛋白水解而得来的，如大多数的蛋白酶原水解后转变为蛋白酶。一般真核细胞中一个基因对应一个 mRNA，一个 mRNA 对应一条多肽链，但少数情况下一种 mRNA 翻译后的多肽链经水解后产生几种不同的蛋白质或多肽，如哺乳动物的鸦片样促黑皮质激素原（proopio-melano-cortin，POMC）初翻译产物为 265 个氨基酸，在垂体前叶细胞中，POMC 初切割成为 N-端片段和 C-端片段的 β-促脂解激素（β-LT，lipotropin），然后 N-端片段又被切割成较小的 N-端片段和 39 肽的促肾上腺皮质激素（ACTH），而在脑下垂体中叶细胞中，β-促脂解激素再次被切割产生β-内啡肽（β-endorphin）；ACTH 也被切割产生 13 肽的促黑激素（α-melanotropin）。

（二）高级结构的修饰包括亚基聚合、多肽折叠和辅基连接

有许多蛋白质是由两个以上亚基构成，并需要各亚基肽链通过非共价键聚合成多聚体才能表现出完整的生物活性，如由两条 α 链、两条 β 链所组成的人血红蛋白、细胞膜上的镶嵌蛋白和跨膜蛋白等。

新生肽链必须逐步折叠成天然空间构象才能成为有活性的功能蛋白。一般认为，蛋白质一级结构是其空间结构形成的基础，同时也需要其他的酶、蛋白质辅助才能完成折叠过程。分子伴侣（molecular chaperone）是一类能识别肽链的非天然结构、并能促进各功能域和整体蛋白质的正确折叠的酶或蛋白分子，它能介导其他蛋白质正确装配成有功能活性的空间结构，而本身并不参与最终装配产物的组成。目前认为“分子伴侣”蛋白有两类：①蛋白因子：如热休克蛋白（heat shock protein，HSP）、伴侣素（chaperonins），它们可以和部分折叠或没有折叠的蛋白质分子结合，稳定它们的构象，使其免遭其他酶的水解或促进蛋白质折叠成正确的空间结构。②酶：如蛋白质二硫键异构酶（protein disulfide isomerase，PDI），可以识别和水解非正确配对的二硫键；肽-脯氨酸顺反异构酶（peptide prolyl cis-trans isomerase，PPI）能促进多肽链中肽酰-脯氨酸肽链的顺反异构体之间的转换。有些蛋白，特别是结合蛋白和带辅基的酶，合成后都需要结合相应辅基，才能成为天然功能蛋白质。

真核细胞内蛋白质的表达水平不仅决定于蛋白质合成的速率，也取决于蛋白质降解（degradation）的速率。真核细胞内蛋白质的降解主要有两种途径，一是溶酶体的吞噬，二是依赖泛素-蛋白酶体（ubiquitin-proteasome）对蛋白质的降解，后者是真核细胞中选择性蛋白质降解的主要途径。泛素-蛋白酶体对蛋白质的降解需要首先将蛋白质泛素化（ubiquitination），即将 76 个氨基酸大小的泛素共价结合到目的底物蛋白的赖氨酸残基上，带有泛素的蛋白质就如同加上一个“标签”一样，被贴上“标签”的蛋白质就会被细胞内的蛋白酶体（由多个亚单位组成的蛋白酶复合体）降解。

第四节　基因表达的调控

遗传信息（基因信息）由 DNA 转录为 RNA、再由 RNA 翻译为蛋白质，通常称为基因的表达。基因表达的实质是通过基因的转录和翻译，产生具有特异生物学功能的蛋白质分子，赋予细胞或个体一定的功能或形态表型。基因的表达受到严密和精确的调控，以适应环境、维持生长和发育的需要。遗传信息传递过程中任何环节的改变均会导致基因表达的变化，基因表达的调控可发生在遗传信息传递的各个阶段。基因表达的调控一般表现为正性调控（positive regulation）和负性调控（negative regulation），前者使基因表达量增加，后者则是使基因表达量减少。在介绍基因的表达调控之前，首先了解一下基因表达的特点。

一、基因表达的一般特点

同一个体所有细胞都具有相同的基因组，携带个体生存、发育、活动和繁殖所需要的全部遗传信息。但生物基因组的遗传信息（基因）不是同时全部都表达出来，即使是极其简单的生物（如最简单的病毒），其基因组所含的全部基因也不是以同样的强度同时表达。

（一）基因表达具有时间性和空间性

基因表达具有严格的时间和空间特异性，这是由基因的启动子等调控序列与调节蛋白相互作用决定的。

例如，病原体侵入宿主后呈现一定的感染阶段，随感染阶段的发展、生长环境的变化，有些基因开启，有些基因关闭。按照功能需要，某一特定基因表达严格按照一定的时间顺序发生，这称为基因表达的时间特异性（temporal specificity）。多细胞生物从受精卵到组织、器官形成的各个不同发育阶段，都会有不同的基因严格按照自己特定的时间顺序开启或关闭，表现为分化、发育阶段一致的时间性，也称为阶段特异性（stage specificity）。

在个体某一发育、生长阶段，同一基因产物在不同的组织器官中表达多少是不一样的。一种基因产物在个体的不同组织或器官中表达，即在个体的不同空间出现，这就是基因表达的空间特异性（spatial specificity）。不同组织细胞中不仅表达的基因数量不相同，而且基因表达的强度和种类也各不相同，这就是基因表达的组织特异性（tissue specificity）。例如肝细胞中涉及编码鸟氨酸循环酶类的基因表达水平高于其他组织细胞，合成的某些酶（如精氨酸酶）为肝脏所特有。

（二）基因表达有组成性表达和可诱导/阻遏表达两种方式

1. 组成性表达　组成性表达（constitutive expression）是指不太受环境变动而变化的一类基因表达。其中某些基因表达产物是细胞或生物体整个生命过程中都持续需要且必不可少的，这类基因可称为管家基因（housekeeping gene），这些基因中大多是在生物个体的不同组织细胞、甚至在同一物种的细胞中都是持续表达的，可以看成是细胞基本的基因表达。组成性基因表达也不是一成不变的，其表达强弱是受一定机制调控的。

2. 诱导/阻遏表达　又称适应性表达（adaptive expression）指环境的变化容易使其表达水平变动的一类基因表达。应环境条件变化基因表达水平增高的现象称为诱导（induction），这类基因被称为可诱导的基因（inducible gene）；相反，随环境条件变化而基因表达水平降低的现象称为阻遏（repression），相应的基因被称为可阻遏的基因（repressible gene）。

改变基因表达的情况以适应环境，在原核生物、单细胞生物中尤其显得突出和重要，因为这些细胞的生存环境经常会有剧烈的变化。例如，周围有充足的葡萄糖，细菌就可以利用葡萄糖作为能源和碳源，不必更多去合成利用其他糖类的酶类；当外界没有葡萄糖时，细菌就要适应环境中存在的其他糖类（如乳糖、半乳糖、阿拉伯糖等），开放能利用这些糖的酶类基因，以满足生长的需要。即使是内环境保持稳定的高等哺乳类动物，也经常要变动基因的表达来适应环境。例如，与适宜温度下生活相比较，在冷或热环境下适应生活的动物，其肝脏合成的蛋白质图谱就有明显的不同；长期摄取不同的食物，体内合成代谢酶类的情况也会有所不同。

二、原核基因的表达调控

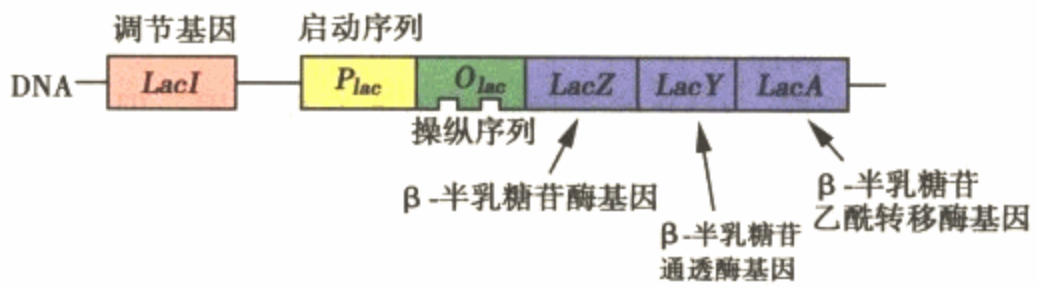
相对于真核细胞，原核细胞的基因表达调控机制比较简单，研究得较为深入。转录调控是原核生物基因表达调控的关键步骤。原核生物大多数基因表达调控是通过操纵子机制

实现的。操纵子（operon）由结构基因和表达调控元件组成，是原核细胞中最常见的表达调控单位。操纵子机制在原核基因表达调控中具有普遍意义。

原核基因表达调控最典型的代表是大肠杆菌（*E.coil*）乳糖操纵子（lac operon）调控模式。在此，以乳糖操纵子为例说明原核基因的表达调控机制。

（一）大肠杆菌乳糖代谢相关基因组成乳糖操纵子

大肠杆菌的乳糖操纵子含 *LacZ*、*LacY* 和 *LacA* 三个结构基因，分别编码 β-半乳糖苷酶（β-galactosidase）、β-半乳糖苷通透酶（permease）和 β-半乳糖苷乙酰转移酶（transacetylase），此外还有一个操纵序列 O_{lac}、一个启动序列 P_{lac} 及一个调节基因 *LacI*（图 9-15）。*LacI* 编码一种阻遏蛋白（repressor），后者与 O_{lac} 序列结合，使操纵子受阻遏而处于关闭状态。在启动子 P_{lac} 上游还有一个分解（代谢）物激活蛋白（catabolite activator protein，CAP）的结合位点。由 P_{lac} 序列、O_{lac} 序列和 CAP 结合位点共同构成乳糖操纵子的调控区，三个酶的编码基因都由同一调控区调节，实现基因产物的协调表达。

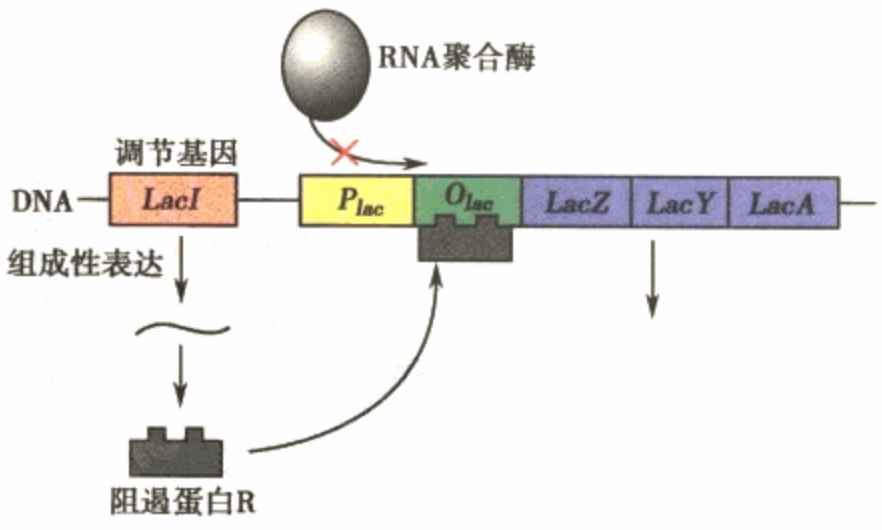


● 图 9-15　大肠杆菌的乳糖操纵子结构示意图

（二）大肠杆菌的乳糖操纵子调控机制包括正、负调控两种方式

1. 阻遏蛋白的负性调控　当大肠杆菌在没有乳糖的环境中生存时，乳糖操纵子处于阻遏状态。*LacI* 在其自身的启动子 P_i 控制下，低水平、组成性表达产生阻遏蛋白 R，每个细胞中仅维持约 10 个分子的阻遏蛋白。R 以四聚体形式与操纵序列 O_{lac} 结合，阻碍了RNA聚合酶与启动子 P_{lac} 的结合，阻止了基因的转录起动。这种阻遏蛋白与操纵子结合后能减弱或阻止结构基因转录的调控方式称为负性调控。R 的阻遏作用不是绝对的，R 与 O_{lac} 偶尔解离，使细胞中还有极低水平的 β-半乳糖苷酶及 β-半乳糖苷通透酶的生成。当有乳糖存在时，乳糖受 β-半乳糖苷酶的催化转变为半乳糖，与 R 结合，使 R 构象变化，R 四聚体解聚成单体，失去与 O_{lac} 的亲和力，与 O_{lac} 解离，基因转录开放，这样使 β-半乳糖苷酶在细胞内的含量增加 1 000 倍左右（图 9-16）。

2. CAP 的正性调控　大肠杆菌中的 cAMP 含量与葡萄糖的分解代谢有关，当大肠杆菌利用葡萄糖供能时，cAMP 含量降低；相反，当环境中无葡萄糖可供利用时，cAMP 的含量增高。大肠杆菌中有一种能与 cAMP 特异结合的 CAP 蛋白，在 CAP 与 cAMP 结合之前它是没有活性的，当大肠杆菌中的 cAMP 浓度升高时，CAP 与 cAMP 结合并发生空间构象的变化而活化，它能以二聚体的形式与乳糖操纵子的启动子 P_{lac} 上游的 CAP 结合位点相结合，从而增强 RNA 聚合酶的转录活性，使转录提高 50 倍（图 9-17）。相反，当有葡萄糖可供分解利用时，cAMP 浓度降低，CAP 不能被活化，乳糖操纵子的结构基因表达下降。这种活化的 CAP 蛋白与操纵子结合后能增强结构基



● 图 9-16　阻遏蛋白与乳糖操纵子调控

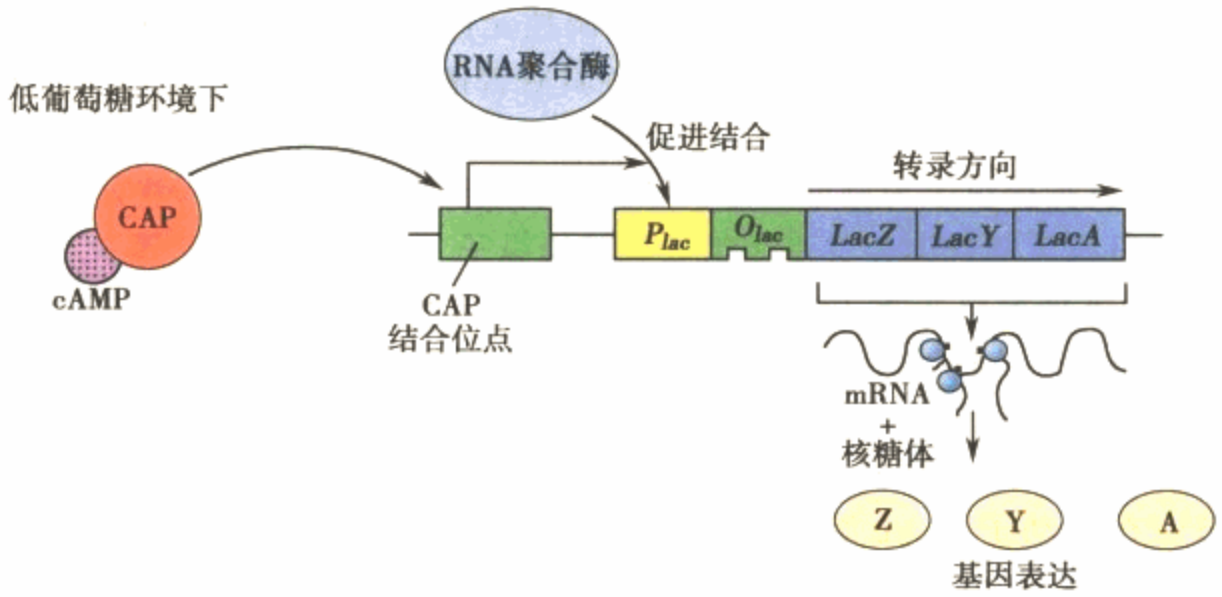


图 9-17　CAP 的正性调控机制

因转录的调控方式称为正性调控。

当阻遏蛋白 R 封闭转录时，CAP 的正性调控不能发挥作用；但如果没有 CAP 存在来加强转录活性时，即使阻遏蛋白从操纵序列上解离，乳糖操纵子仍然几乎没有转录活性。可见，上述两种机制相辅相成、互相协调、相互制约。乳糖操纵子的负性调节机制能更好地解释单纯乳糖存在时，细菌是如何利用乳糖作碳源的。然而细菌生长环境是复杂的，例如有葡萄糖或葡萄糖/乳糖共同存在时，细菌首先利用葡萄糖才是最节能的。这时，葡萄糖的存在使细菌内的 cAMP 浓度降低，通过阻碍 cAMP 与 CAP 结合来抑制乳糖操纵子转录，使细菌只能利用葡萄糖。

三、真核基因的表达调控

真核细胞的基因表达调控要比原核细胞复杂得多。由于核膜的存在，真核细胞基因的转录与蛋白质的翻译分别在细胞内不同的区域进行。真核细胞基因表达调控可以在转录水平、RNA 加工水平、RNA 转运水平、mRNA 降解水平、翻译水平和蛋白质活性水平上进行(图 9-18)。对大多数基因来说，转录水平是最重要的控制点。此外，在某些细胞中 DNA 水平的变化如染色质上基因拷贝数的变化、DNA 重排、DNA 甲基化等也会影响基因的表达，这将在第十四章细胞分化中介绍。

(一) 转录水平调控是真核细胞基因表达的主要控制点

转录水平调控是对基因表达转录起始的调节。真核基因具有复杂的调控区，它包括启

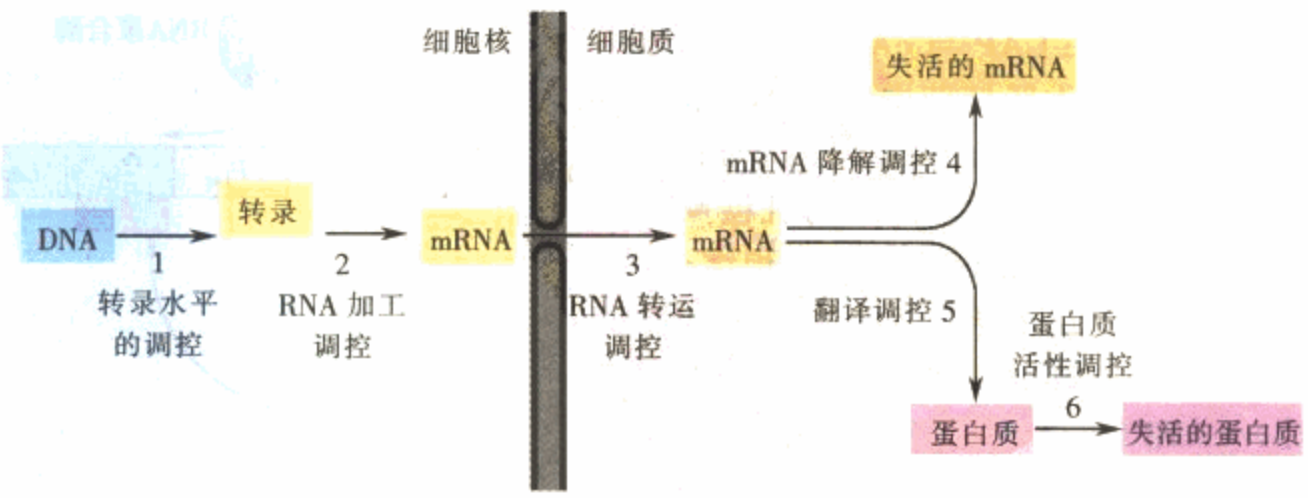
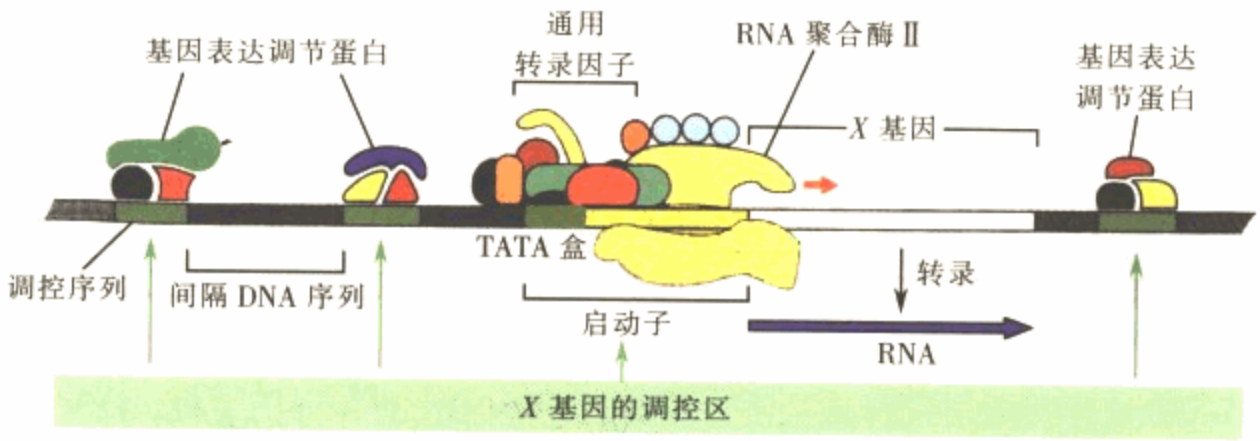


图 9-18　真核基因表达调控的途径

动子区和其他能调节基因表达的转录因子和基因调节蛋白结合位点，影响基因表达的各种因子通过与 DNA 调控区的结合而增强或抑制基因的表达。图 9-19 显示了真核细胞基因表达调控区的一般结构。真核细胞中存在多种基因表达调节蛋白，它们能促进或抑制基因的转录，有些基因表达调节蛋白是特异性的 DNA 结合蛋白，它们能够和靶基因相邻的 DNA 序列结合；还有一些基因表达调节蛋白虽然不能直接与 DNA 结合，但它们可通过与其他基因表达调节蛋白的相互作用调控基因转录，通常将基因表达调节蛋白称做反式作用因子（trans-acting factor），将它们所识别的 DNA 序列叫做顺式作用元件（cis-acting element）。具体地讲，顺式作用元件是对基因表达有调节活性的 DNA 序列，其活性只影响与其自身同处在一个 DNA 分子上的基因，这种 DNA 序列一般不编码蛋白质，多位于基因旁侧或内含子中。基因表达的调节是通过反式作用因子与顺式作用元件相互作用而实现的。



●图 9-19　真核细胞基因表达调控区示意图

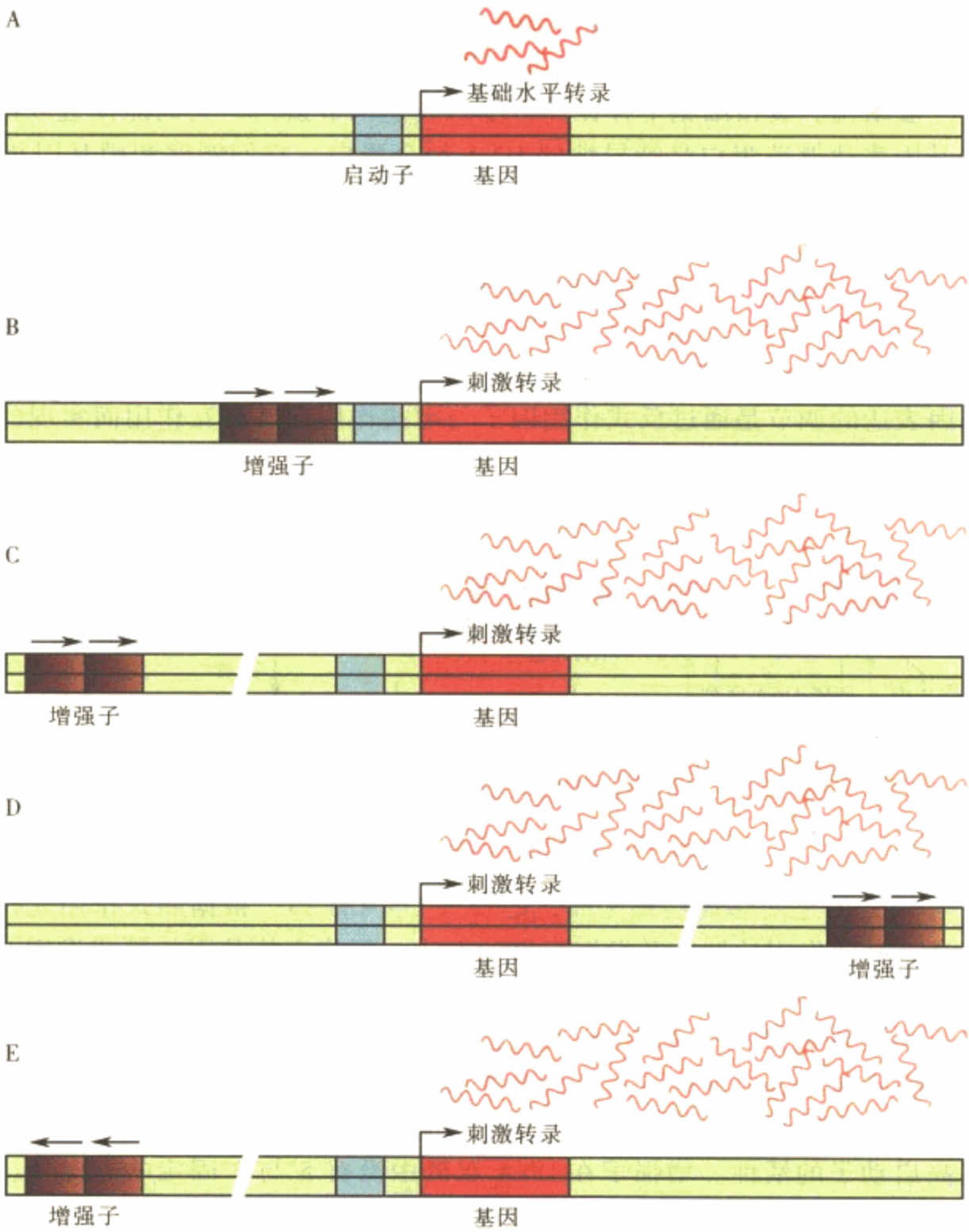
1. 顺式作用元件是能够调控基因表达的特殊 DNA 序列　根据顺式作用元件在基因组中的位置、转录激活作用的性质及发挥作用的方式，可将真核基因的顺式作用元件分为启动子、增强子（enhancer）和沉默子（silencer）。

启动子是决定细胞基因转录起始、能被 RNA 聚合酶所识别并结合的特异性 DNA 序列，它是基因准确和有效地进行转录所必需的结构（详见本章第一节）。

增强子是一种能增强真核细胞某些启动子功能的调节序列，不具有启动子的功能，但能增强或提高启动子的活性。增强子在 DNA 双链中没有 5′与 3′固定的方向性，作用不受序列方向性的限制。增强子在所调控基因的上游或下游均可发挥作用，但大多位于上游；下游内含子中，乃至下游最后一个外显子以外的序列也可含有增强子。增强子在距离启动子相对较远（距启动子数 kb 至数十 kb）时也能发挥作用。增强子一般有组织或细胞特异性，但对启动子的影响无严格的专一性。基因重组实验证明，同一增强子可影响不同类型的启动子，真核生物增强子也可影响原核生物的启动子（图 9-20）。

在顺式作用元件中还存在一种与增强子作用相反的沉默子。沉默子是基因表达的负性调控元件。当特异蛋白因子与其结合时，对基因转录起阻遏作用。沉默子最早在酵母中发现，后来在 T 淋巴细胞的 T 抗原受体基因的转录和重排中也证实了这种负调控顺式元件的存在。目前对这种在基因转录降低或关闭中起作用的序列研究还不多，但从已有的例子来看，沉默子的作用可不受序列方向的影响，能远距离发挥作用，并可对异源基因的表达起作用。

2. 反式作用因子通过顺式作用元件调控基因的表达　真核基因表达的调节蛋白又称转录调节因子或转录因子。绝大多数真核转录调节因子由它的编码基因表达后，通过与特异的顺式作用元件的识别、结合（即 DNA-蛋白质相互作用）反式激活另一基因的表达。RNA 聚合酶和转录因子就是反式作用因子。能直接结合 DNA 序列的反式作用因子是少数，但不同的反式作用因子之间可以相互作用，因而目前认为多数转录因子是通过蛋白质-蛋白质间作用与 DNA 序列联系并影响转录效率的，转录因子之间或转录因子与 DNA



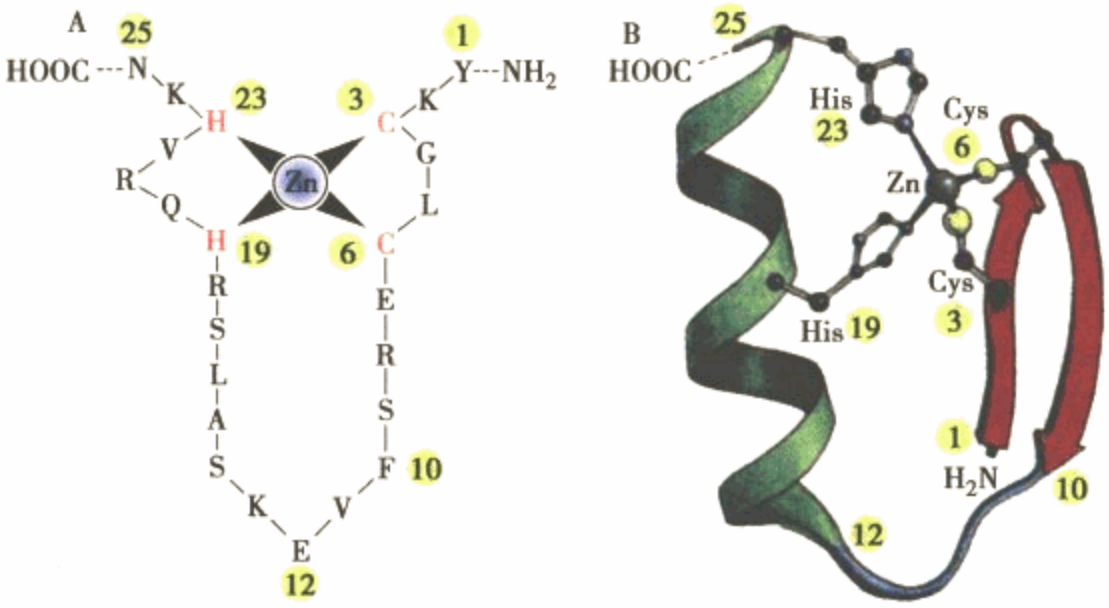
●图 9-20　增强子作用模式示意图

没有增强子存在时，基因转录维持在较低的基础水平（A）；当有增强子存在时，可以使转录水平升高。增强子可以紧邻启动子上游（B），也可位于转录起始位点的上游或下游几个 kb 处（C 和 D）；与转录方向相反的增强子也可刺激转录（E）

的结合都会引起构象的变化，从而调节转录。

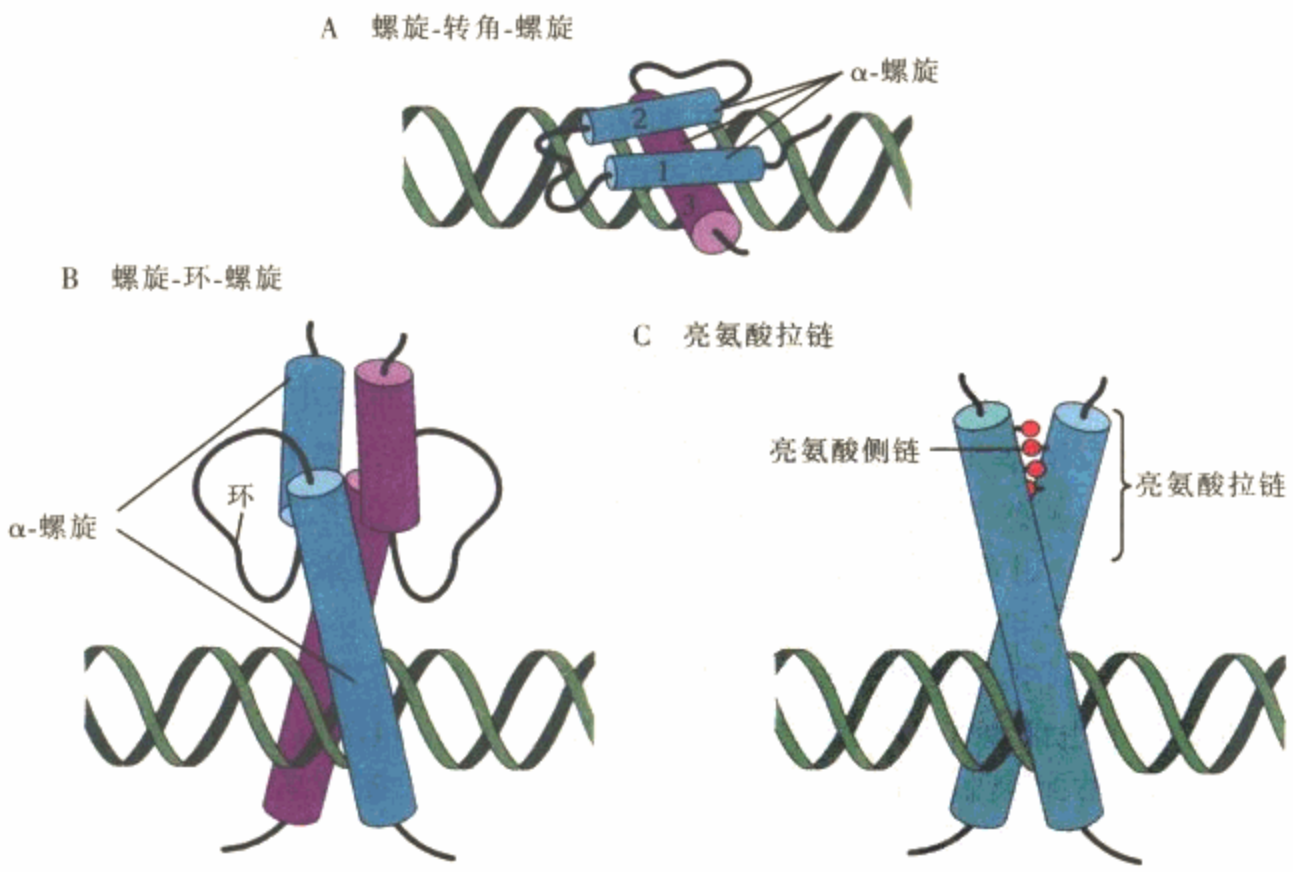
作为蛋白质的转录因子从功能上分析其结构，可包含有不同区域：①DNA 结合域（DNA binding domain）：多由 60~100 个氨基酸残基构成的几个亚区组成。其他一些不与 DNA 直接结合的转录因子没有 DNA 结合域，但能通过转录激活域直接或间接作用于转录复合体而影响转录效率。②转录激活域（activating domain）：常由 30~100 个氨基酸残基组成，该结构域包含富含酸性氨基酸、富含谷氨酰胺、富含脯氨酸等不同种类。③连接区：即连接上两个结构域的部分。

与 DNA 结合的转录因子大多以二聚体形式起作用，其 DNA 结合域常见有以下几种：①锌指（zinc finger）结构，是最常见的 DNA 结合域，它由约 23 个氨基酸残基组成，其中的半胱氨酸和组氨酸通过配位键与锌原子结合，这样形成一个以锌原子为中心的“指”状



●图 9-21　一种典型的锌指结构

结构，称为锌指结构。锌指结构的 N-末端形成 β-片层，C-末端形成 α-螺旋，α-螺旋能够与 DNA 大沟相结合（图 9-21）。一个转录因子中常常含有多个串联重复的锌指结构，如与 GC 盒结合的转录因子 SP1 中就含有 3 个重复的锌指结构，这些锌指结构中的 3 个α-螺旋恰好等于 DNA 大沟的一圈。②螺旋-转角-螺旋（helix-turn-helix，HTH），如图 9-22 A 所示，这类结构域通常由 3 个 α-螺旋结构组成，其中一个螺旋与 DNA 大沟结合，另两个螺旋则位于其上面起稳固作用。例如，参与大肠杆菌乳糖操纵子调控的 CAP 蛋白以及真核细胞中的同源域（homeodomain）蛋白中就含有 HTH 结构域。③螺旋-环-螺旋（helix-loop-helix，HLH），这类结构至少有两个 α-螺旋，螺旋间由短肽段形成的环连接，两个具有 HLH 结构的转录因子以二聚体形式相连，两个较长的 α-螺旋刚好能够嵌入 DNA 的大沟(图 9-22B)。例如，参与肌细胞生成的转录因子 MyoD 蛋白就含有 HLH 结构域。④亮氨酸拉链（leucine zipper），该结构的特点是蛋白质分子的肽链上每隔 6 个氨基酸就有一个亮氨酸残基，结果导致这些亮氨酸残基都在 α-螺旋的同一个方向出现，两个这样的 α-螺旋肽链单体就能通过亮氨酸残基以疏水键结合形成二聚体。该二聚体另一端



●图 9-22　几种其他常见的反式作用因子 DNA 结合域

的肽段形成“Y”形的结构（富含碱性氨基酸残基）与 DNA 大沟结合（图 9-22C）。在肝、小肠上皮、脂肪细胞和某些神经细胞中有称为 C/EBP（CCAAT/enhancer-binding protein）家族成员的一类蛋白质能够与 CAAT 盒结合，其特征就是能形成具有亮氨酸拉链的二聚体结构。

总之，反式作用因子能够通过识别启动子、启动子近旁和增强子等顺式作用元件中的特异靶序列并与之结合（即蛋白质-DNA 相互作用），以及通过蛋白质-蛋白质的相互作用，最终影响 RNA 聚合酶活性，从而对基因表达发挥正调控或负调控作用。通常把发挥正调控作用的反式作用因子称为转录激活蛋白（activator）。

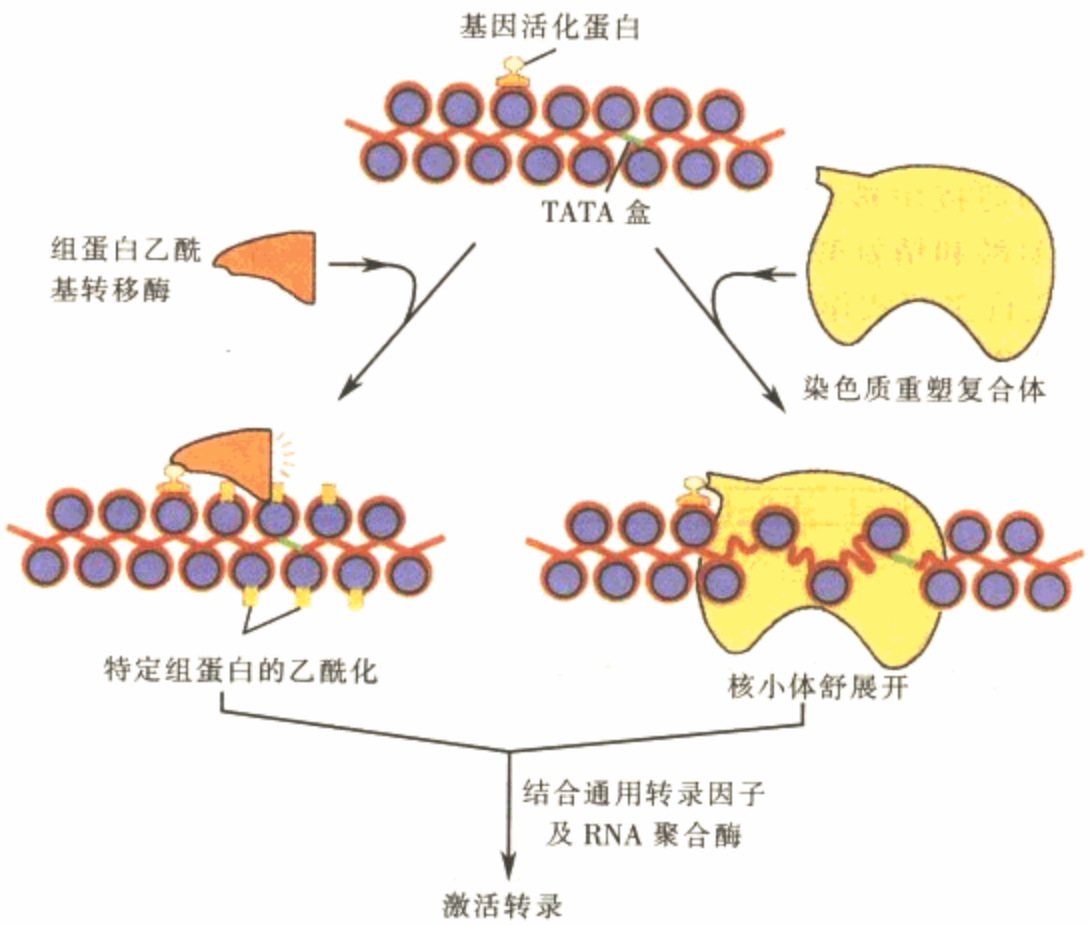
3. 真核细胞的阻遏蛋白　真核细胞中除存在发挥正性调控作用的转录激活蛋白之外，还有一类阻遏蛋白（repressor）也参与了真核细胞基因表达的负性调控。与原核细胞中起同样作用的分子一样，真核阻遏蛋白通过与特定的 DNA 序列结合而抑制转录。其中，某些阻遏蛋白通过干扰其他转录因子与 DNA 的结合来发挥抑制作用，例如，在转录起始位点附近结合的阻遏蛋白可以阻止 RNA 聚合酶或通用转录因子与启动子的相互作用；另一些阻遏蛋白则通过与转录激活蛋白竞争结合 DNA 分子中的调控序列发挥作用，这些阻遏蛋白含有和激活蛋白相同的 DNA 结合域，但是阻遏蛋白没有转录激活域，无法激活转录。这类阻遏蛋白抑制基因转录的实质是，通过阻止激活蛋白与启动子或增强子的结合，抑制转录。

另一类阻遏蛋白，称为活性阻遏蛋白（active repressor），与那些仅仅干扰激活蛋白结合的阻遏蛋白不同，它们虽然也有 DNA 结合域，但主要靠功能结构域通过蛋白质-蛋白质的相互作用来抑制转录，例如果蝇的 *Krüppel* 基因，其表达的蛋白质即为活性阻遏蛋白。Krüppel 蛋白中除了含有一个能够与 DNA 结合的锌指结构域之外，还存在一个独立的抑制结构域，Krüppel 蛋白与 DNA 结合后，依赖其抑制结构域与特定的转录激活蛋白、中介蛋白或通用转录因子相互作用而抑制转录。

阻遏蛋白对基因转录的调控作用扩展了人们对真核细胞基因表达调控机制的认识。阻遏蛋白一个重要的功能可能是抑制组织特异性基因在不适当细胞中的表达。例如，免疫球蛋白基因的增强子中含有阻遏蛋白的结合位点，该位点与阻遏蛋白的结合有助于抑制非淋巴细胞中免疫球蛋白的表达，确保免疫球蛋白的组织特异性表达。

4. 染色质结构影响基因的转录　染色质是高度有序的紧密结构，限制了转录因子对 DNA 的接近和结合，控制着真核细胞基因的转录。基因表达激活首先需要将致密压缩的染色质/核小体舒展开来，该过程涉及具有酶活性的功能蛋白复合体参与，通过调整核小体结构，中和组蛋白碱性氨基酸残基上的正电荷来减弱组蛋白与 DNA（携负电荷）间的结合，从而降低相邻核小体间的聚集，增加转录因子的进入，最终促进基因转录。这种染色质结构的动态变化过程通常称为染色质重塑（chromatin remolding）。染色质重塑是基因表达调控的主要方式之一，它包括：①依赖 ATP 的物理修饰，即以 ATP 水解释放的能量，使组蛋白和 DNA 的构象发生局部改变；②共价化学修饰，即发生在组蛋白上的化学修饰，如组蛋白的乙酰化、甲基化、磷酸化和泛素化等。组蛋白的乙酰化是组蛋白修饰后影响基因表达的常见方式，某些基因表达调节蛋白通过影响组蛋白的乙酰化和去乙酰化而调节基因的转录（图 9-23）。组蛋白的乙酰化能激活基因的转录，组蛋白去乙酰化则能抑制基因的转录（详见第十四章细胞分化）。

5. 非编码 RNA 能够调节基因转录　近年来的研究显示，除了转录调节蛋白以外，一些非编码 RNA 分子也能调节基因的转录。微小 RNA（microRNA，miRNA）是在细胞中自然存在，且能够调节基因表达的短片段非编码 RNA 分子。研究表明，在动物和植物细胞中存在数百个 miRNA 的编码基因，这提示 miRNA 的基因表达调控是一种普遍现象，但目前大多数 miRNA 的功能仍不是很清楚。目前研究显示，miRNA 的作用机制为：首先，

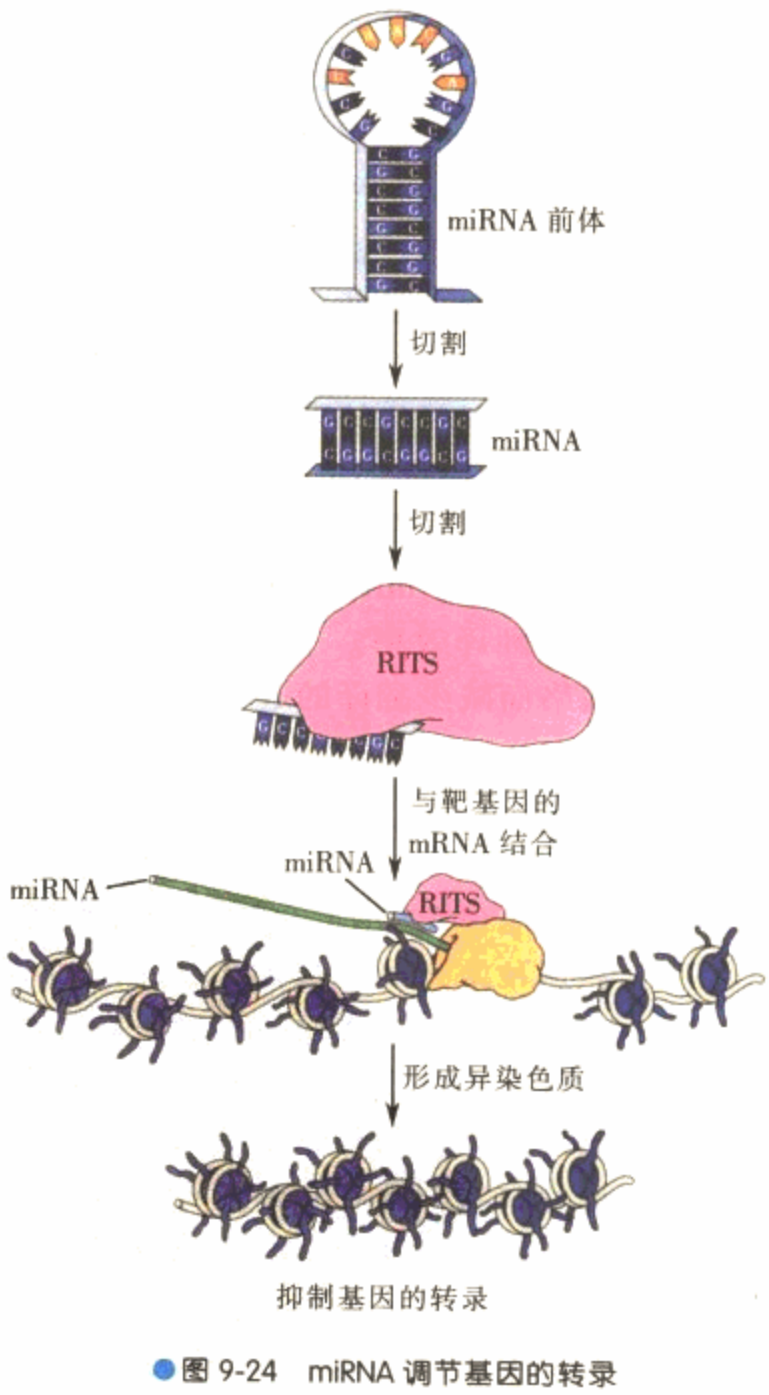


●图 9-23　真核细胞中基因活化蛋白通过影响局部染色质的结构而激活转录

miRNA 编码基因转录形成呈茎-环结构的 miRNA 前体分子，这些前体分子经过切割形成成熟的 miRNA，即长约 20~25nt 的短双链分子；在 miRNA 发挥 RNA 干扰作用时，miRNA 与RISC（RNA-induced silencing complexs）结合，使 miRNA 的双链解离，其中一条链则与同源的 mRNA 靶向结合，发挥切割、降解 mRNA 的作用（第二章 图 2-13）；在 miRNA 发挥转录抑制作用时，miRNA 则与另一种蛋白质复合体——RITS（RNA-induced transcriptional silencing）复合体结合，解离后的一条 miRNA 链将 RITS 复合体引导至同源基因处（很可能是通过碱基配对结合于同 RNA 聚合酶Ⅱ结合的 mRNA 上），然后，RITS 复合体通过募集组蛋白甲基转移酶，使组蛋白 H3 的赖氨酸-9 发生甲基化，导致异染色质形成，最终抑制基因的转录（图 9-24）。

（二）RNA 加工水平调控的主要途径是剪接

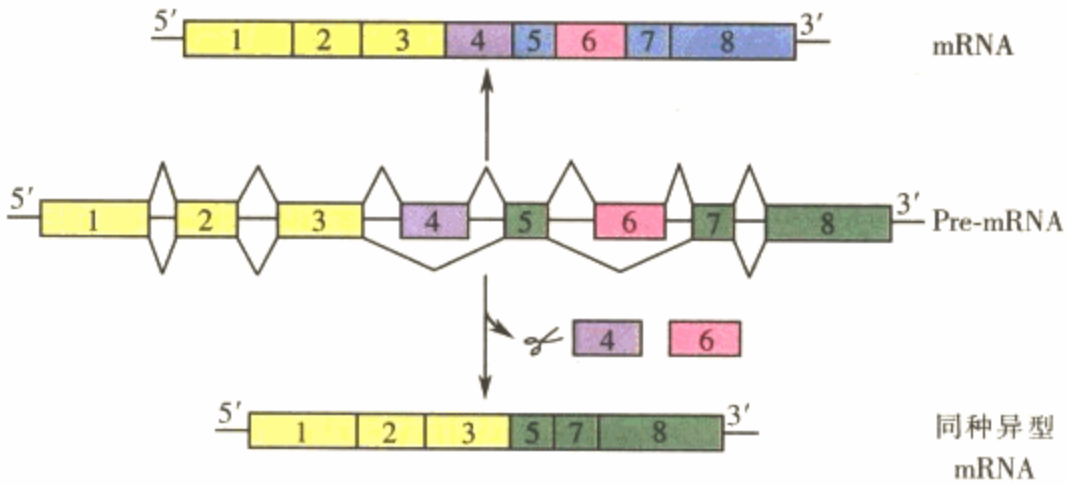
以外显子和内含子为单元的基因结构形式是真核细胞基因结构的特点，人类的大多数基因中都含有内含子。多数真核细胞的 mRNA 前体分子经剪接去除内含子后仅形成一种成熟的 mRNA，并经过翻译生成一条相应的多肽链，这种 RNA 剪接方式称为常规剪接(constitutive splicing)。但许多高等真核细胞的 mRNA 前体不止含有一个内含子，在特定条件下，剪接发生在两个内含子之间，即某个内含子的 5′端与另一个内含子的 3′端进行剪接时，就会删除



●图 9-24　miRNA 调节基因的转录

这两个内含子及其中间的全部外显子或内含子，这称为 RNA 可变剪接(alternative splicing)(图 9-25)。由此，一个基因的 mRNA 前体经过可变剪接可以产生多种不同的蛋白质，或形成一组相似的蛋白质家族。

mRNA 前体的剪接由被称为剪接体的核酸-蛋白质复合物完成，该复合物主要包括 snRNA 及富含丝氨酸和精氨酸的相关蛋白。剪接首先是剪接体识别 mRNA 前体剪接位点，剪接位点的选择受许多顺式作用元件和反式作用因子的调控。反式作用因子可以通过识别正性或负性的顺式作用元件对不同的剪接位点进行选择。此外，剪接体中的剪接因子也参与了对选择性剪接的调控。



●图 9-25　mRNA 前体可变剪接示意图

(三) 真核细胞基因表达的翻译水平调控与起始因子磷酸化密切相关

真核细胞翻译水平调节点主要在翻译起始阶段和延长阶段，尤其是起始阶段。如起始因子活性的调节、Met-tRNA^{met} 与核糖体小亚基结合的调节、mRNA 与小亚基结合的调节等。其中通过磷酸化作用改变起始因子活性这一点备受关注。蛋白质合成速率的快速变化很大程度上取决于起始水平，通过磷酸化调节起始因子活性对起始阶段有重要的控制作用。如 eIF-2α 亚单位的磷酸化可以阻碍 eIF 的正常运行，从而抑制蛋白质合成的起始。eIF-2α 亚单位的磷酸化由特异蛋白激酶催化。在病毒感染的细胞中，细胞抗病毒机制之一即是通过双链 RNA（double-strande RNA，dsRNA）激活一种蛋白激酶，使 eIF-2α 磷酸化，从而抑制蛋白质合成的起始。

此外，mRNA 的 5′UTR（非翻译区）与 3′UTR 在翻译过程中能够相互依赖、协同作用提高翻译效率。一些蛋白质能够识别 mRNA 的 3′UTR，通过干扰 3′poly-A 尾与 5′端帽的联络而减少翻译的起动。

小结

基因是 DNA 分子中含有特定遗传信息的核苷酸序列。目前一般将基因分为结构基因和调控基因。基因是遗传信息的贮藏形式，遗传信息的流向一般是 DNA→RNA→蛋白质，这称为分子生物学的中心法则。在原核细胞中，功能相关的结构基因串联排列。真核基因一般是由若干内含子和外显子构成的不连续镶嵌结构的基因。除内含子和外显子之外，完整的基因还包括位于编码区上游的启动子和基因末端的终止子。真核细胞基因结构最显著的特征之一是存在许多功能未知、有多个拷贝的 DNA 重复序列。

基因转录是遗传信息从 DNA 流向 RNA 的过程。在双链 DNA 中，作为转录模板的链称为模板链或反义链，与模板链互补的另一条链称为编码链或有意义链。转录的本质是一个以 DNA 双螺旋链中反义链为模板，以四种核苷三磷酸 ATP、GTP、CTP、UTP 为原料，

在 RNA 聚合酶作用下，遵循碱基互补配对原则合成 RNA 的过程。原核细胞基因的转录包括起始阶段、延长阶段和终止阶段。真核细胞基因转录形成初级转录产物的基本过程与原核细胞相似，也分为转录的起始、延长和终止，但所需酶及各种蛋白因子有所不同，真核细胞中转录形成的 RNA 前体分子通常需要经过复杂的加工修饰过程才能成为成熟的功能形式。真核细胞中含有多种 RNA 聚合酶，其中 RNA 聚合酶Ⅱ负责 mRNA 的转录。mRNA 的初级转录本是 hnRNA。转录形成的前体 RNA 需经过加工过程成为成熟的 mRNA，才能进入细胞质进行蛋白质合成。mRNA 加工过程包括 5′末端加上“帽子”结构、3′末端加上“尾”结构和剪接。剪接是将 RNA 前体分子中内含子切除，将外显子拼接的过程。在 RNA 聚合酶Ⅰ催化下转录形成原始 rRNA 前体——45S rRNA，最终被剪切为 28S、18S 和 5.8S rRNA。在真核细胞中含有多个编码 tRNA 的基因，在 RNA 聚合酶Ⅲ的作用下被转录为 tRNA 前体，这种新转录生成的 tRNA 前体需要进行剪接和碱基修饰才能形成成熟的 tRNA。

翻译是 mRNA 指导蛋白质合成的过程。在翻译过程中 mRNA 作为翻译的模板，决定蛋白质中的氨基酸顺序；tRNA 作为运输工具，携带氨基酸准确进入指定位置；rRNA 与多种蛋白质组成核糖体，作为蛋白质合成的装配机器。在 mRNA 链上 3 个相邻的碱基可以决定一个特定的氨基酸，这种核苷酸三联体被称为密码子，mRNA 上的碱基排列顺序叫做遗传密码。蛋白质生物合成可分为五个阶段：氨基酸的活化、多肽链合成的起始、肽链的延长、肽链的终止和释放、蛋白质合成后的加工修饰。从核糖体 mRNA 链释放的新生多肽链尚不具有生物活性，必需经过化学修饰和加工处理，才能形成具有天然构象和生物学活性的功能蛋白。

基因的表达受到严密和精确的调控。遗传信息传递过程任何环节的改变均会导致基因表达的变化。原核细胞大多数基因表达调控是通过操纵子机制实现的。操纵子由结构基因和表达调控元件组成，是原核细胞中最常见的表达调控单位。真核细胞基因表达调控可以发生在转录水平、RNA 加工水平、RNA 转运水平、mRNA 降解水平、翻译水平和蛋白质活性水平。转录水平调控是真核细胞基因表达的主要控制点。通常将真核细胞的基因表达调节蛋白称做反式作用因子，将它们所识别的 DNA 序列叫做顺式作用元件。真核基因的顺式作用元件包括启动子、增强子和沉默子。反式作用因子通过顺式作用元件调控基因的表达。作为蛋白质的转录因子，其结构中一般包含 DNA 结合域和转录激活域。螺旋-转角-螺旋、锌指结构、碱性亮氨酸拉链是常见的 DNA 结合域。真核细胞中除存在发挥正性调控作用的转录激活蛋白之外，还有一类阻遏蛋白，它通过与特定的 DNA 序列结合参与真核细胞基因表达的负性调控。染色质结构的动态变化过程通常称为染色质重塑，它是基因表达调控的主要方式之一。除了转录调节蛋白以外，一些非编码 RNA 分子也能调节基因的转录。在真核细胞中，一个基因的 mRNA 前体经过可变剪接可产生多种不同的蛋白质。真核细胞基因表达的翻译水平调控与起始因子磷酸化密切相关。

（朱振宇）

第三篇　细胞的社会性

第十章　细胞连接与细胞粘连

在胚胎发育过程中，细胞通过分裂、分化，然后迁移到达预定区，通过细胞识别、黏着和连接机制，形成各种组织、器官和系统，最终形成完整的有机体。人体组织的形态建成既是细胞分化的结果，也是细胞通过表面分子相互识别、黏着以及形成特殊细胞连接的结果。细胞之间、细胞与细胞外基质之间通过细胞表面特殊的黏附分子彼此识别和黏着；通过相邻细胞表面形成特殊连接装置加强彼此间的机械联系和功能协调。细胞之间、细胞与细胞外基质之间的相互作用是组织形成、维持及修复的最主要的保证，而细胞连接（cell junction）与细胞粘连（cell adhesion）是细胞间结构和功能联系的基本形式。本章将重点从细胞连接与细胞黏着方面介绍细胞的社会性。

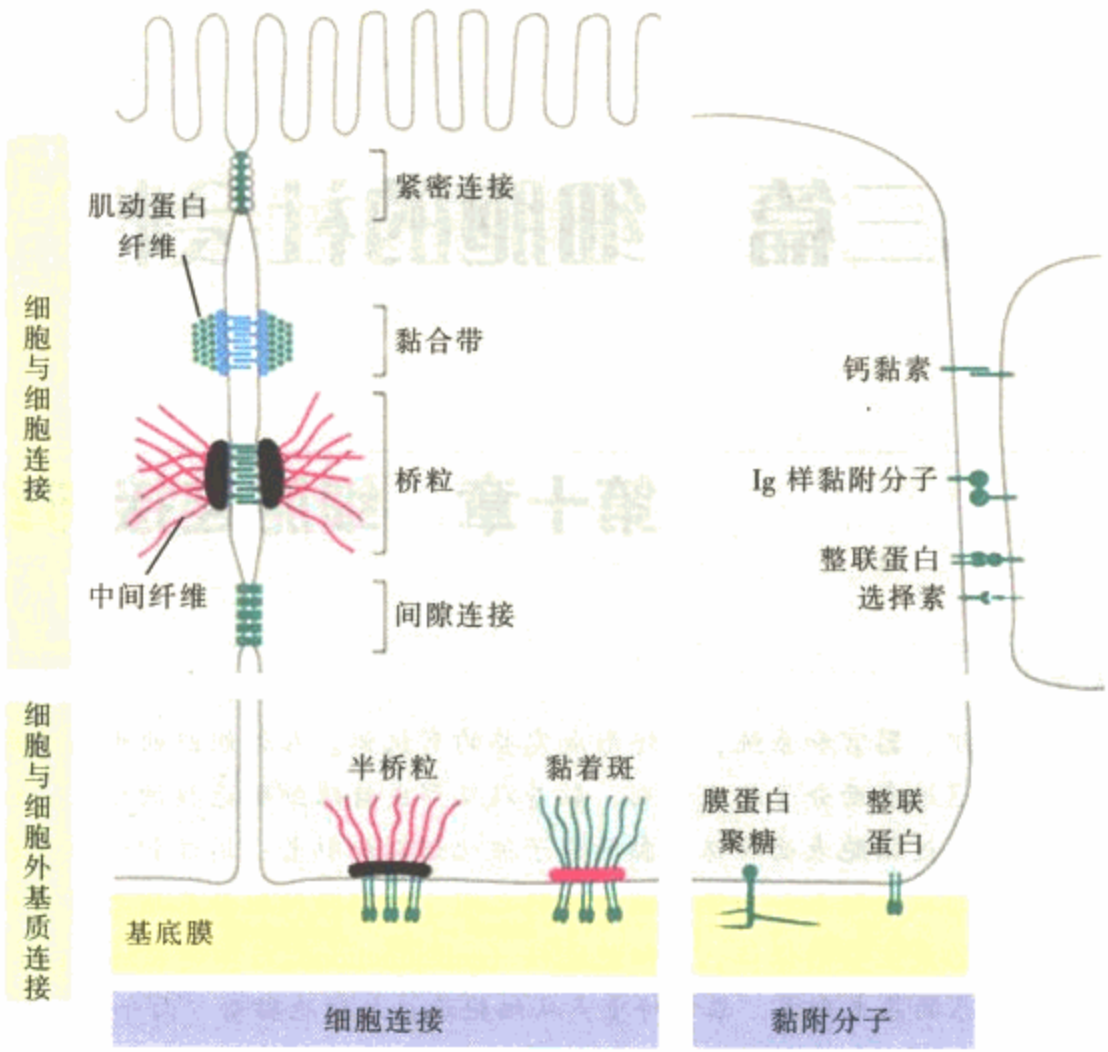
第一节　细 胞 连 接

人和动物体内除结缔组织和血液外，各种组织的细胞之间按一定排列方式，在相邻细胞表面形成各种连接装置，以加强细胞间的机械联系和维持组织结构的完整性，协调性，这些相邻细胞之间、细胞与细胞外基质之间在质膜接触区域特化形成的连接结构称为细胞连接。

细胞连接是维系细胞间相对稳定的特化连接装置，也是相邻细胞之间协同作用的重要组织形式。细胞连接有多种类型，根据其结构和功能特点可分为三大类，即封闭连接（occluding junction）、锚定连接（anchoring junction）和通讯连接（communicating junction）（表 10-1、图 10-1）。

表 10-1　细胞连接的类型

功能分类	结构分类	主 要 特 征	主 要 分 布
封闭连接	紧密连接	相邻细胞膜形成封闭链	上皮细胞、脑微血管内皮细胞
锚定连接	黏合连接	肌动蛋白纤维参与的锚定连接	
	黏合带	细胞-细胞连接	上皮细胞
	黏着斑	细胞-细胞外基质连接	上皮细胞基部
	桥粒连接	中间纤维参与的锚定连接	
	桥粒	细胞-细胞连接	心肌细胞、上皮细胞
	半桥粒	细胞-细胞外基质连接	上皮细胞基部
通讯连接	间隙连接	由连接子介导细胞通讯	大多数动物组织细胞
	化学突触	神经细胞突触通讯	神经元和神经-肌细胞间

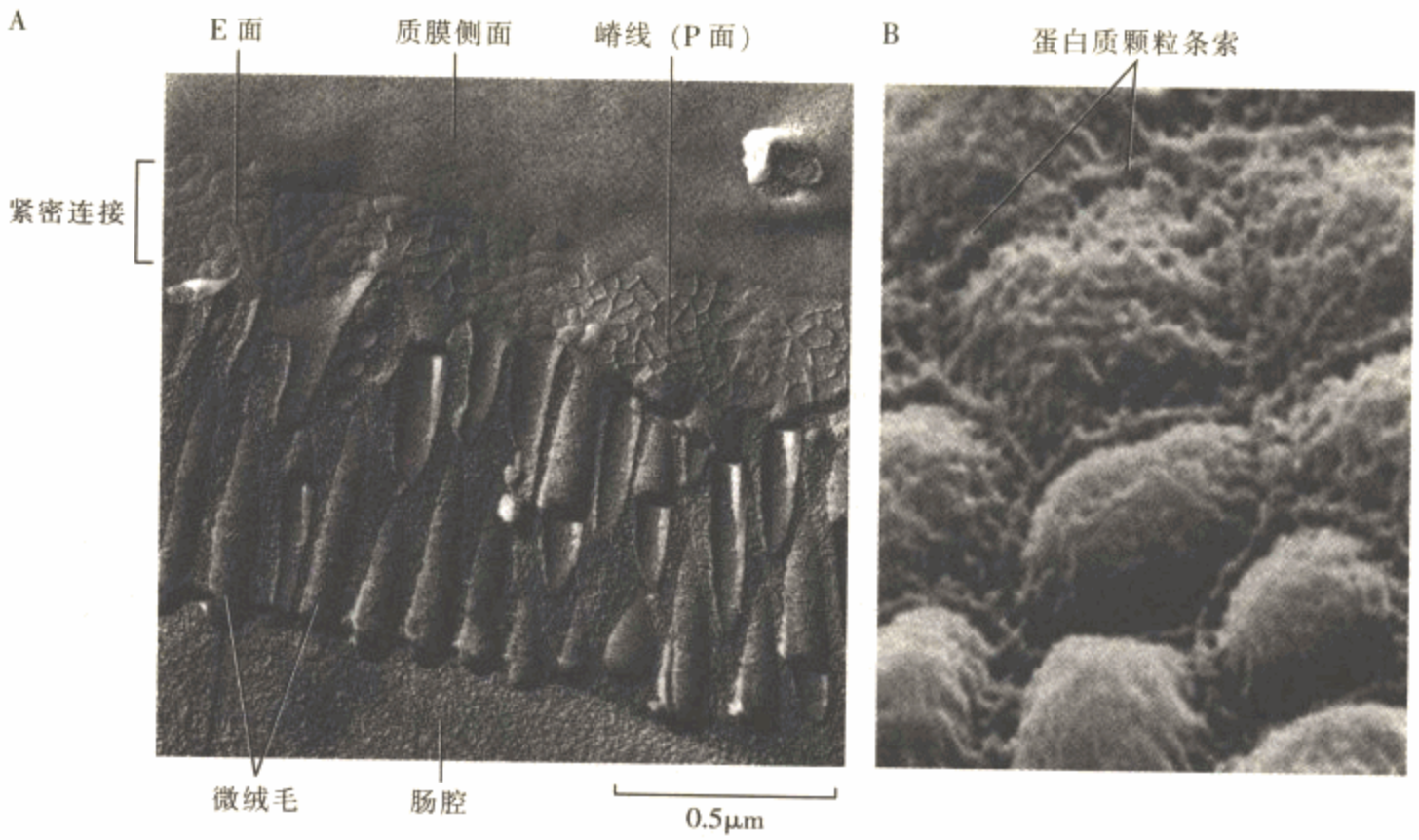


●图 10-1　细胞连接、细胞粘连和细胞外基质

一、紧密连接

人和脊椎动物体内的封闭连接只有一种，称为紧密连接（tight junction）。紧密连接广泛分布于各种上皮细胞，如消化道上皮、膀胱上皮、曲细精管生精上皮的支持细胞基部和腺体的上皮细胞管腔面的顶端区域；此外，脑毛细血管内皮细胞之间也存在紧密连接结构。透射电镜显示，在紧密连接处，两个相邻细胞质膜以断续的点连在一起，而不是以大片区域紧密连接，点状接触部位没有缝隙。冷冻断裂复型技术显示，紧密连接区域是一种“焊接线”样的带状网络（图 10-2A）。焊接线又称嵴线，扫描电镜显示，两个相邻细胞膜上的嵴线由特殊的跨膜蛋白排列形成蛋白质颗粒条索，将细胞间隙封闭起来（图 10-2B）。在膜脂双层外层的胞质面（P 面），有蛋白颗粒连成的嵴网；在膜脂双层内层的质膜外侧面（E 面），则是与凸起的蛋白颗粒对应互补的沟，就像拉链头对头地连接成特征性结构——封闭索（sealing strand），封闭索交错成网状，环绕每个上皮细胞的顶部，将相邻细胞紧密连接在一起，封闭细胞间隙（图 10-3A）。在各种组织中紧密连接对一些小分子的密封程度有所不同，与上皮细胞间形成的封闭索层数有关，如肾小管上皮细胞之间紧密连接的封闭索只有 1~2 层，胰腺腺泡细胞为 3~4 层，而小肠上皮细胞多达 4~6 层以上，层数越多，封闭作用越强。

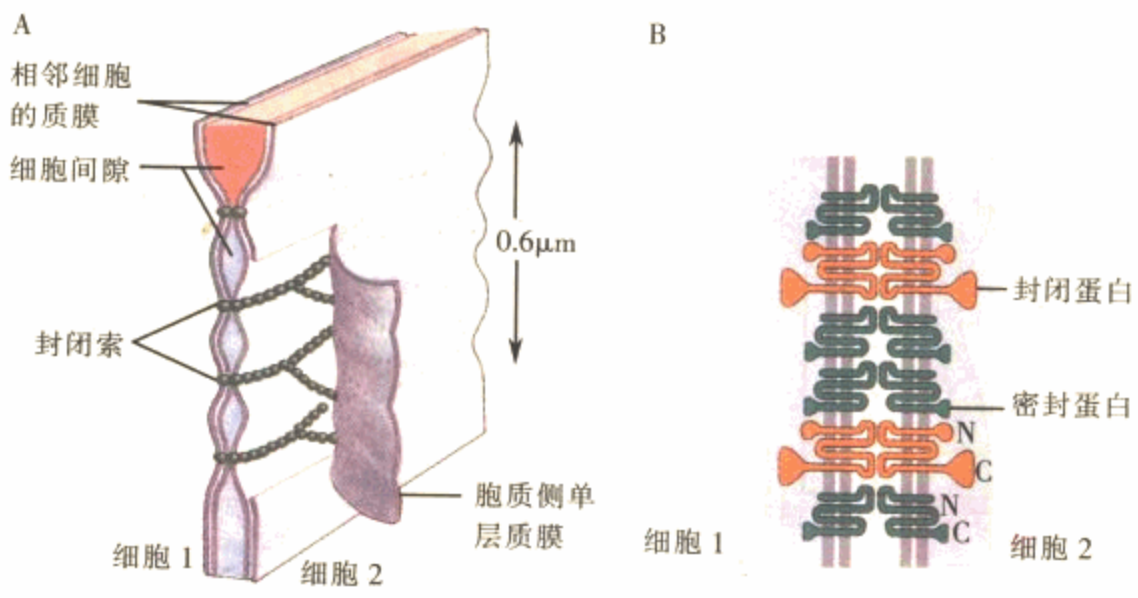
目前已经分离出数十种参与紧密连接形成的跨膜蛋白，如封闭蛋白（claudin）、密封蛋白（occludin）、Zonula occluden（ZO）蛋白等。前两种蛋白均是 4 次穿膜的膜整合蛋白，C-末端和 N-末端均伸向细胞质，对紧密连接的形成和功能起重要作用（图 10-3B）。如肾小管上皮细胞从原尿中重吸收 Mg^{2+}时需要封闭蛋白的存在，如果编码这种蛋白的基因发生突变，可以引起 Mg^{2+}从尿中大量丢失。



●图 10-2　小肠上皮细胞紧密连接电镜照片

A. 冷冻断裂复型电镜照片，示细胞微绒毛和细胞紧密连接区

B. 扫描电镜照片，示蛋白质颗粒条索



●图 10-3　紧密连接模式图

A. 相邻质膜上蛋白颗粒连成的封闭索　B. 紧密连接中的两种跨膜蛋白

紧密连接有两个主要功能：一是封闭上皮细胞的间隙，形成一道与外界隔离的封闭带，防止细胞外物质无选择地通过细胞间隙进入组织，或组织中的物质回流入腔中，保证组织内环境的稳定。如小肠上皮细胞的紧密连接结构，对腔内大部分物质起着阻隔作用。脑毛细血管内皮以及睾丸支持细胞之间的紧密连接构成了血脑屏障（blood-brain barrier）和血睾屏障（blood-testis barrier），保护这些重要器官和组织免受异物侵害。

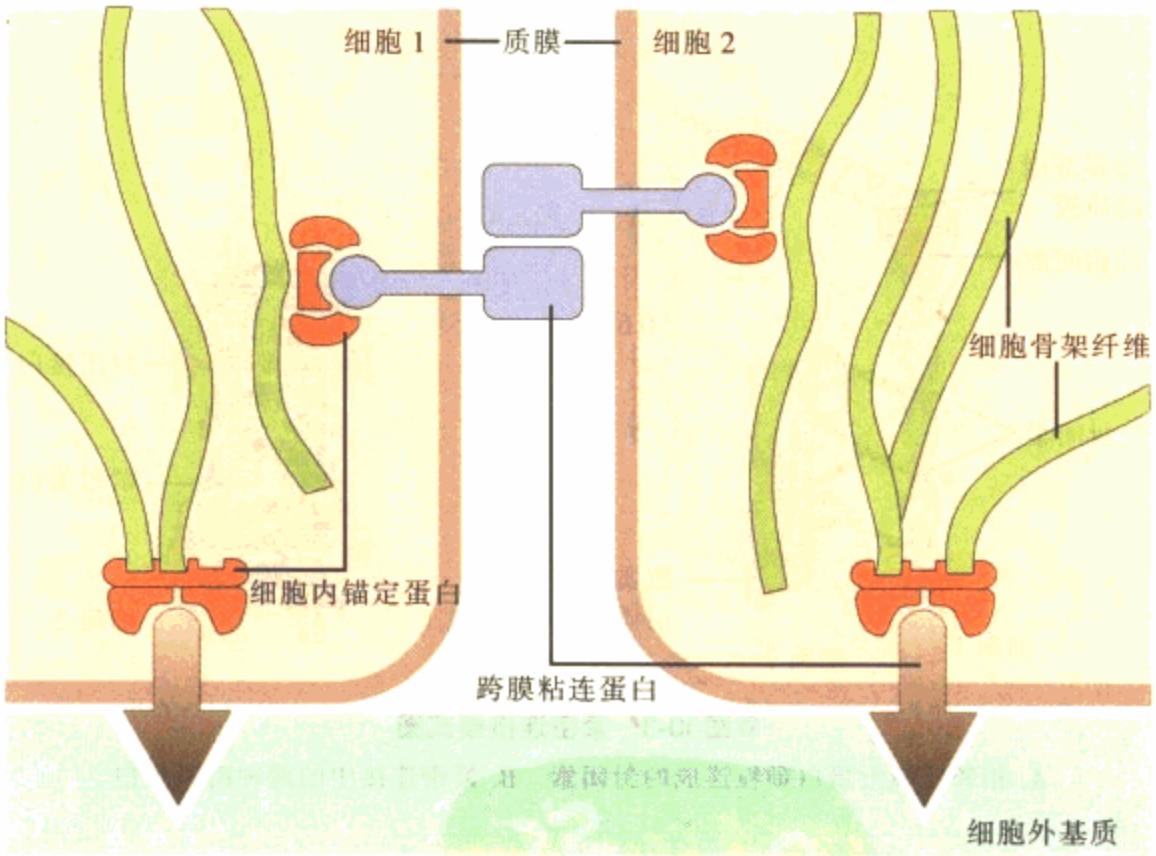
紧密连接的第二个功能是形成上皮细胞质膜蛋白与膜脂分子侧向扩散的屏障，从而维持上皮细胞的极性。如小肠上皮细胞的紧密连接结构，使肠腔内营养物质只能从上皮细胞的顶部运入细胞内，以保证物质运转的方向性。紧密连接还具有将上皮细胞联合成整体的机械连接作用。

二、锚定连接

锚定连接是一类由细胞骨架纤维参与，存在于相互接触的细胞之间或细胞与细胞外基质之间的细胞连接，其主要作用是形成能够抵抗机械张力的牢固黏合。锚定连接广泛分布于动物各种组织中，特别是在上皮、心肌和子宫颈等需要承受机械压力的组织中尤为丰富。其重要功能是参与组织器官形态和功能的维持、细胞的迁移运动以及发育和分化等多种过程。

根据参与连接的骨架纤维类型和锚定部位的不同，锚定连接可分为两大类：一类为与肌动蛋白纤维相连的锚定连接，称为黏合连接（adhering junction），黏合连接又可分为两类：细胞与细胞之间的黏合连接称为黏合带（adhesion belt）；细胞与细胞外基质间的黏合连接称为黏着斑（adhesion plaque）。另一类与中间纤维相连的锚定连接，称为桥粒连接（desdosome junction），桥粒连接也分为两类：细胞与细胞之间的连接称为桥粒（desmosome）；细胞与细胞外基质间的连接称为半桥粒（hemidesmosome）。

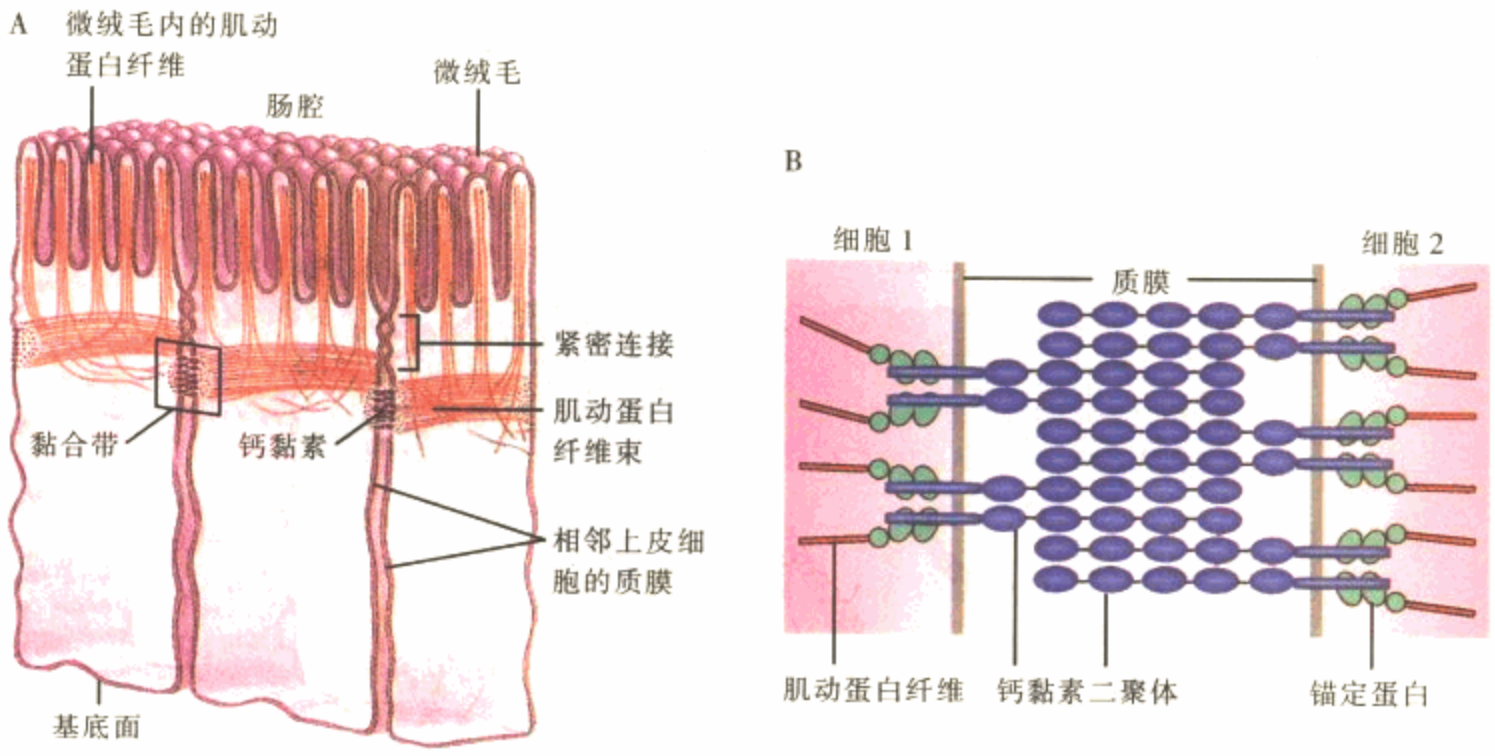
锚定连接由两大类蛋白组成：一类是细胞内锚定蛋白（intracellular anchor protein），这类蛋白在细胞质面将特定的细胞骨架成分（肌动蛋白纤维或中间纤维）同连接复合体（可形成盘状致密斑）连接起来，另一侧与跨膜粘连蛋白相连；第二类蛋白统称跨膜粘连蛋白（transmembrane adhesion protein），是一类细胞黏附分子，一端与细胞内锚定蛋白相连，另一端与相邻细胞特异的跨膜粘连蛋白或与细胞外基质蛋白结合（图 10-4）。



●图 10-4　锚定连接的两类蛋白示意图

（一）黏合连接是由肌动蛋白纤维介导的锚定连接

1. 黏合带　位于上皮细胞紧密连接的下方，是相邻细胞之间形成的一个连续的带状结构（图 10-5A）。透射电镜显示，在黏合带处相邻细胞质膜之间的间隙约 15~30nm，间隙两侧的质膜通过伸出的跨膜粘连蛋白相互黏合（图 10-5B）。参与形成黏合带的跨膜粘连蛋白称为钙黏素（cadherin），属于 Ca^{2+}依赖性细胞黏附分子（有关钙黏素特点与功能见本章第二节）。钙黏素在质膜中形成同源二聚体，相邻细胞的钙黏素胞外部分互相结合，其胞内部分通过细胞内锚定蛋白与肌动蛋白纤维相连，从而使相邻细胞的微丝束通过细胞内



●图 10-5　小肠上皮细胞之间黏合带结构示意图

A. 黏合带模式图　B. 黏合带的分子结构示意图

锚定蛋白和跨膜粘连蛋白连成广泛的跨膜网，使组织连为一个坚固的整体。黏合带胞内侧的锚定蛋白有多种，包括 α、β、γ 连环蛋白（catenin）、纽蛋白（vinculin）和 α-辅肌动蛋白等，形成复杂的多分子复合体，起锚定肌动蛋白纤维的作用。

黏合带为某些组织的细胞，特别是上皮细胞和心肌细胞提供了抵抗机械张力的牢固黏合，在维持细胞形态和组织器官完整性方面具有重要作用。另外由于微丝束具有收缩功能，黏合带在动物胚胎发育中使上皮细胞内陷形成管状或泡状器官原基，从而对形态发生起重要作用。

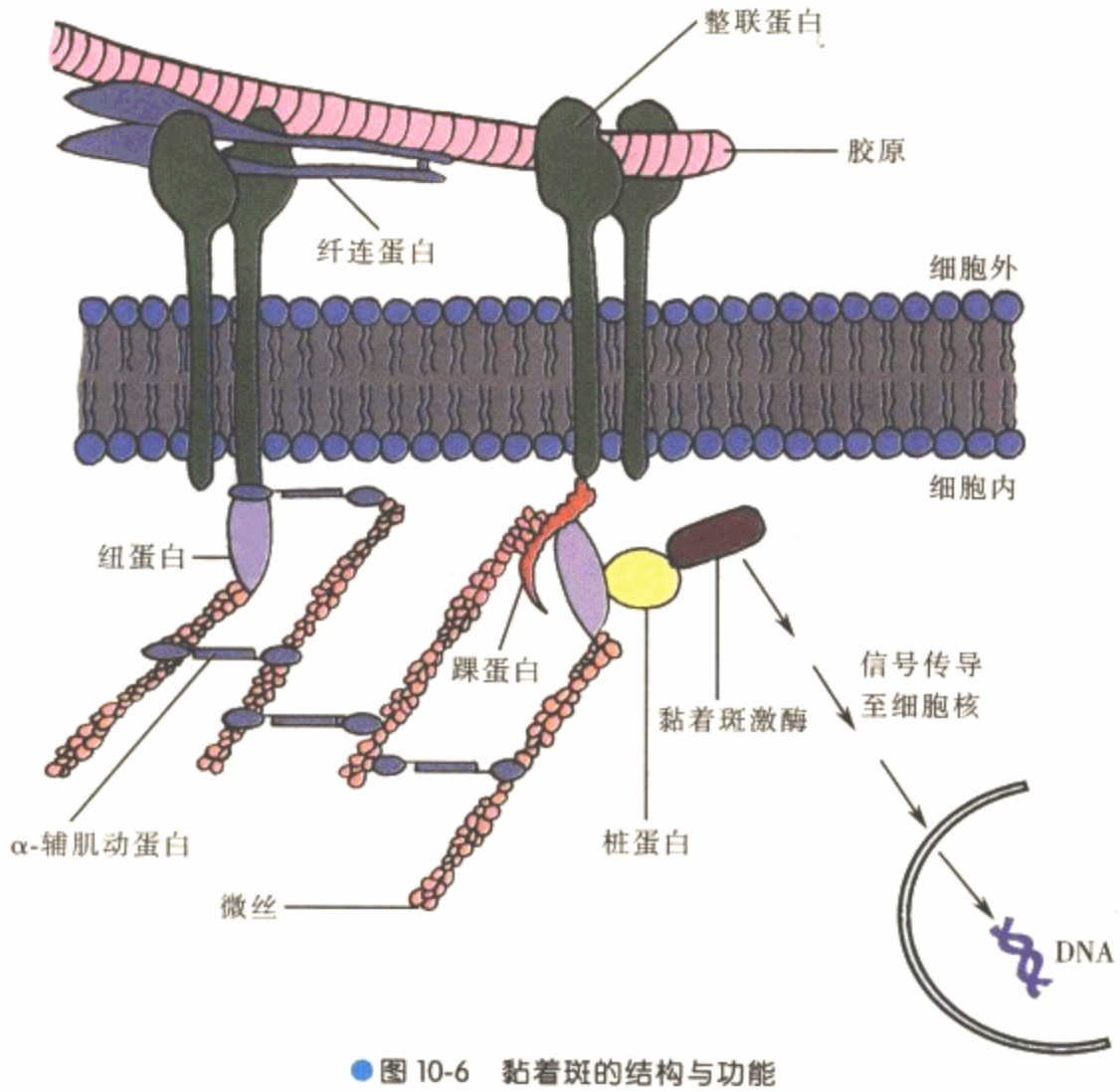
2. 黏着斑　位于上皮基底部，是细胞通过局部黏附与细胞外基质之间形成的黏合连接。参与黏着斑连接的跨膜粘连蛋白是膜整联蛋白（integrin），也称整合素，其胞外区与细胞外基质（主要是纤连蛋白与胶原）成分相连，胞内部分通过锚定蛋白与肌动蛋白纤维相连，从而介导细胞与细胞外基质的黏着（图 10-6）。由于整联蛋白是纤连蛋白的受体，因此，细胞通过整联蛋白与细胞外基质之间的连接是受体与配体之间的识别和结合（有关整联蛋白的特点与功能见本章第二节）。黏着斑部位的锚定蛋白有：踝蛋白（talin）、α-辅肌动蛋白、细丝蛋白（filamin）和纽蛋白等。

黏着斑在肌细胞与肌腱（主要是胶原）形成的连接中很常见。体外培养细胞常通过黏着斑附着于培养皿表面，它的形成与解离对细胞的铺展和迁移具重要意义。

（二）桥粒连接是由中间纤维介导的锚定连接

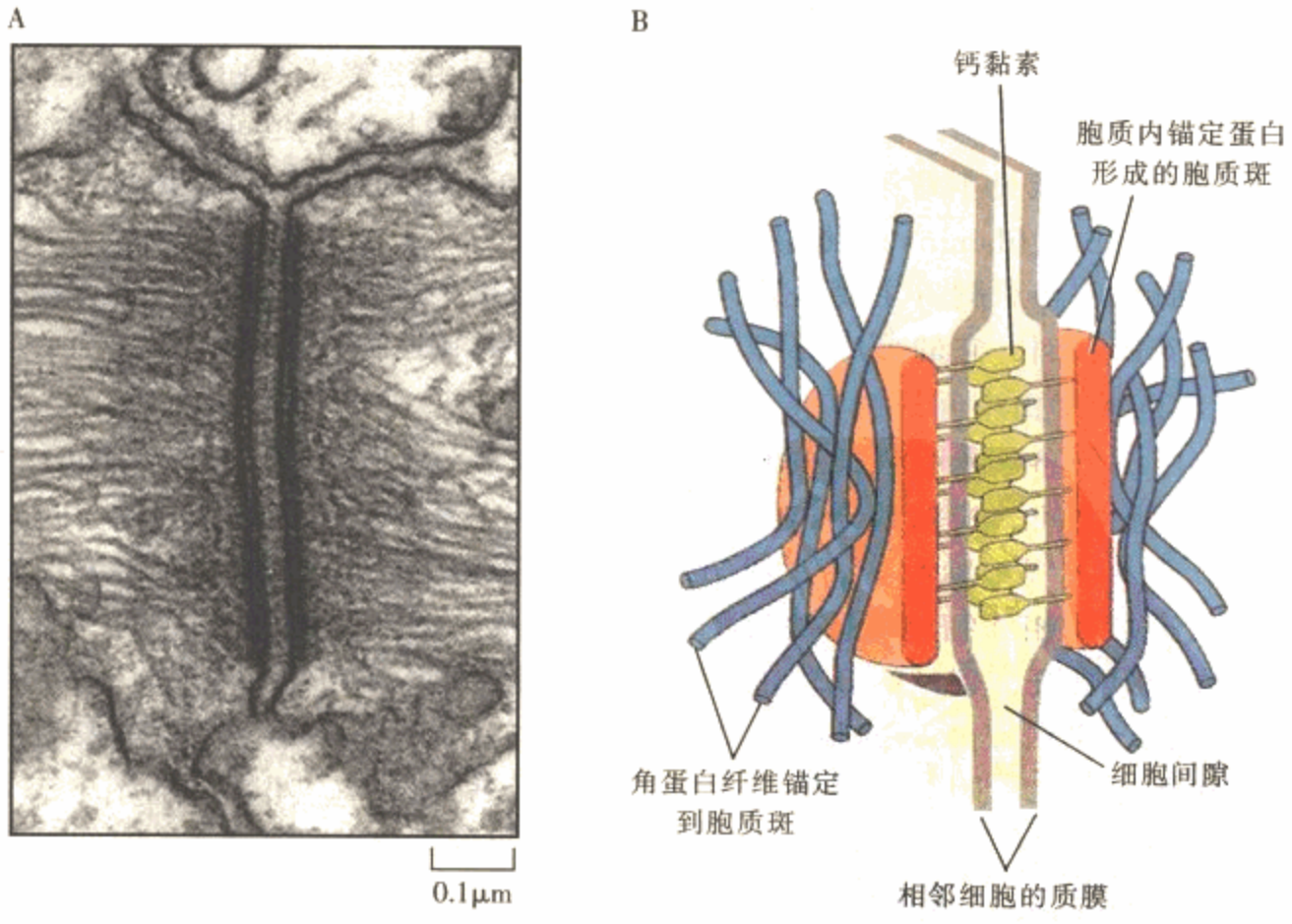
桥粒连接广泛分布于承受强拉力的组织中，如皮肤、心肌、消化道、膀胱、子宫和阴道等处的上皮细胞之间。根据其分布位置不同，可以分为桥粒和半桥粒两种。

1. 桥粒　位于上皮细胞黏合带的下方，是相邻细胞接触点上一种类似纽扣状的结构。电镜下，桥粒连接处相邻细胞质膜之间的间隙约 30nm，质膜的胞质侧各有一个由细胞内锚定蛋白构成的胞质斑，直径约 0.5μm，称为桥粒斑（desmosomal plaque）。桥粒斑是由两种蛋白，即桥粒珠蛋白（plakoglobin）和桥粒斑蛋白（desmoplakin）组成的复合物，是中间纤维附着的部位。在不同类型细胞中附着的中间纤维也不同，如上皮细胞中主要是角蛋白丝（keratin filaments），心肌细胞中则为结蛋白丝（desmin filaments）。中间纤维伸向桥粒斑，并被更细的纤维系牢在胞质斑上，然后折返形成袢环结构。桥粒质膜处的跨膜粘连蛋白为桥粒芯糖蛋白（desmoglei）和桥粒芯胶蛋白（desmocollin），均属于钙黏素家族，其胞内部分与细胞内锚定蛋白构成的桥粒斑相连，胞外部分与相邻细胞的跨膜粘连蛋白相



●图 10-6　黏着斑的结构与功能

连，通过依赖 Ca^{2+}的黏合机制将两个相邻细胞连接在一起（图 10-7）。相邻细胞中的中间纤维通过细胞桥粒斑和跨膜粘连蛋白构成了贯穿整个组织的整体网架，形成增强该组织抵抗外来的张力、压力及撕裂力机械强度的能力。



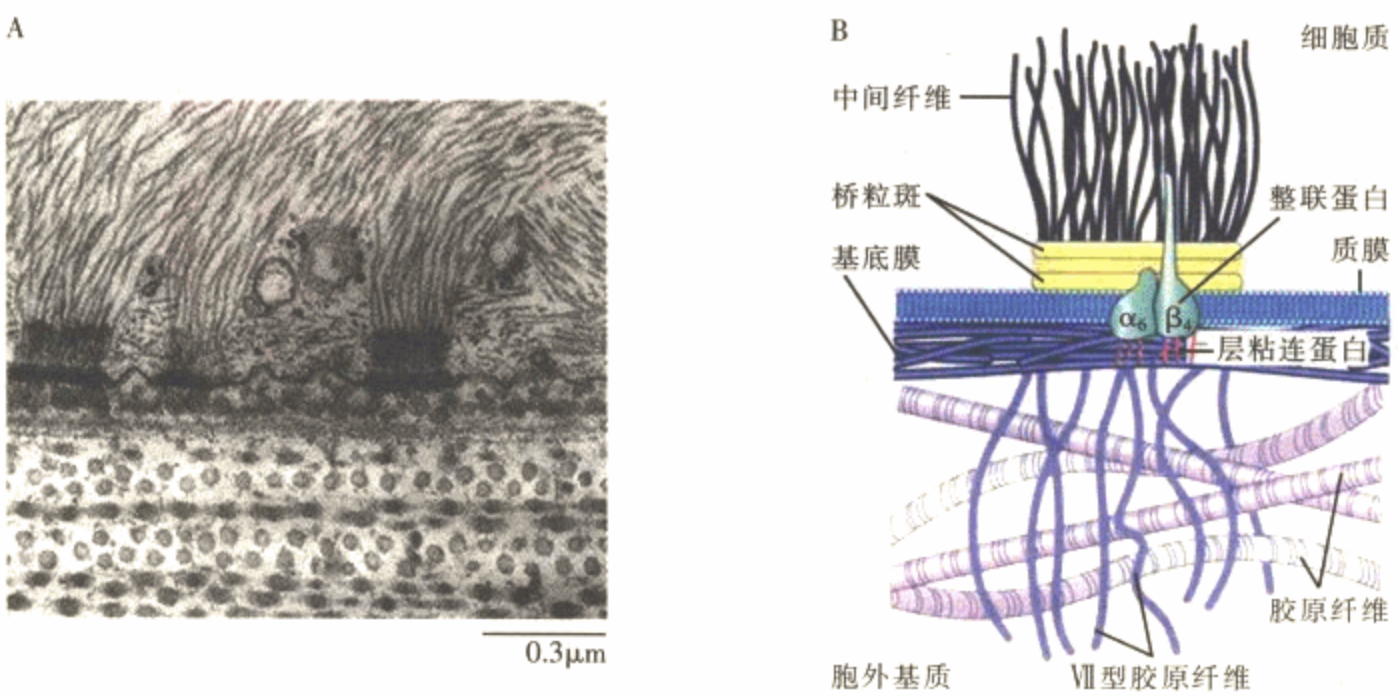
●图 10-7　桥粒的结构

A. 桥粒的电镜照片　B. 桥粒结构模式图

桥粒对上皮细胞结构的维持非常重要。胰蛋白酶、胶原酶、透明质酸酶和 Ca^{2+} 螯合剂（如乙二胺四乙酸）等均能够破坏桥粒结构。

一些皮肤病与桥粒病变有关。临床上一种自身免疫缺陷病——天疱疮（*pemphigus*），就是因为患者自身产生抗桥粒跨膜粘连蛋白抗体而破坏了桥粒结构，导致上皮细胞桥粒连接丧失，组织液通过细胞间隙漏入表皮，引起严重的皮肤水疱病，严重者可危及生命。

2. 半桥粒　是上皮细胞与基底膜之间的连接装置，因其结构仅为桥粒的一半而得名。形态上与桥粒类似，但功能与化学组成不同。半桥粒的胞质斑是由一种称为网蛋白（plectin）的胞内锚定蛋白组成，可与细胞内的中间纤维相连。半桥粒部位的跨膜粘连蛋白是整联蛋白，可与基底膜中层粘连蛋白发生黏附性结合，从而将细胞与基膜牢固地铆在一起（图 10-8）。



●图 10-8　半桥粒的结构

A. 半桥粒结构照片　B. 半桥粒结构模式图

半桥粒主要功能是把上皮细胞与其下方的基底膜连接在一起，防止机械力造成的上皮与其下方的组织剥离。抗半桥粒的自身抗体可导致老年人的大泡性类天疱疮（*bullous pemphigoid*）。层粘连蛋白和整联蛋白 α_6 或 β_4 基因的突变均可引起大泡性表皮松懈症（*epidermolysis bullosa*），其症状与大泡性类天疱疮相似。

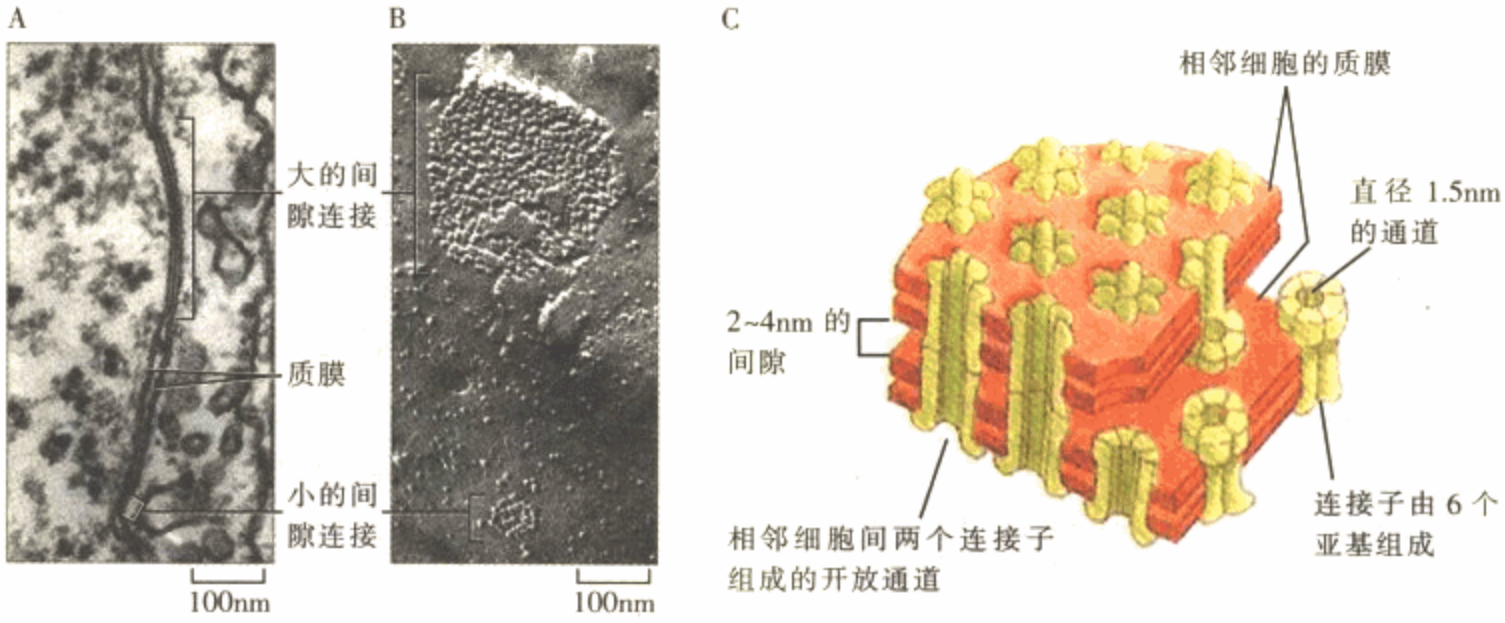
三、通讯连接

生物体大多数组织相邻细胞膜上存在特殊的连接通道，以实现细胞间电信号和化学信号的通讯联系，从而完成群体细胞间的合作和协调，这种连接形式称为通讯连接（communicating junction）。动物组织中的间隙连接（gap junction）和化学突触（chemical synapse）都属于这种通讯连接。

（一）间隙连接是动物组织中普遍存在的一种细胞连接方式

在透射电镜下显示，间隙连接部位相邻细胞膜之间有 2~4nm 的缝隙，因而间隙连接又称缝隙连接。冷冻蚀刻技术显示，许多间隙连接单位往往集结在一起呈斑块状，其区域大小不一，最大直径可达 0.3μm，因此可以用密度梯度离心技术将该区域膜片分离出来。间隙连接的基本结构单位是连接子（connexon）。每个连接子长 7.5nm，外径 6nm，由 6 个相同或相似的跨膜蛋白——连接子蛋白（connexin，Cx）环绕而成，中央形成 1.5~2nm 的

亲水性孔道。相邻质膜上的两个连接子相对接而连在一起，通过中央孔道使相邻细胞质连通（图 10-9）。一个间隙连接处的连接子数目可由几个至成千上万个不等。连接子蛋白是一类 4 次跨膜蛋白，目前已经发现 20 多种不同的连接子蛋白，一个连接子可以由不同的连接子蛋白构成异源连接子，也可以由相同的连接子蛋白构成同源连接子。由不同连接子蛋白所构成的连接子，在通透性、导电率和可调性方面是不同的，它们的分布具有组织细胞特异性。如心肌细胞的连接子蛋白是 Cx43，心脏电传导系统细胞的连接子蛋白是 Cx40，当这两种连接子蛋白形成间隙连接时，连接子之间便没有通透功能，从而保证了心脏器官不同类型细胞功能的相对独立。



● 图 10-9　间隙连接的结构

A. 质膜横切面显示间隙连接　B. 质膜冷冻断裂显示间隙连接的连接子平面分布

C. 间隙连接的连接子结构模式图

间隙连接中相邻细胞膜内连接子颗粒的相互融合，加强了相邻细胞的连接。间隙连接的另一个更重要的功能是介导细胞间通讯，细胞通讯（cell communication）是指一个细胞的信息通过化学递质或电信号传递给另一个细胞，使靶细胞产生相应效应。间隙连接的通讯方式有两种，即代谢耦联和电耦联。

1. 代谢耦联　代谢耦联（metabolic coupling）是由连接子形成的 1.5nm 的亲水性通道，允许分子量 1 000~1 500 以下的水溶性小分子，如无机离子、葡萄糖、氨基酸、核苷酸、维生素、cAMP 等从一个细胞迅速进入另一个细胞质内，从而使两个细胞从电化学和代谢上耦联在一起。这种功能在胚胎发育早期特别重要。在血液循环建立以前，同一发育区的细胞通过代谢耦联使物质平均分配，以控制细胞的分化。当细胞分化时，细胞与其周围组织解耦联，但每个细胞群中的细胞仍相互耦联，以保持发育行为一致。

间隙连接的通透性是可调节的。在实验条件下，降低细胞 pH，或升高钙离子浓度均可降低间隙连接的通透性。当细胞受损时，大量钙离子进入，导致间隙连接关闭，以免正常细胞受到伤害。肿瘤细胞的这种间隙连接明显减少或完全丧失，认为可能是肿瘤细胞生长失去控制，获得自主性生长的原因之一。

2. 电耦联　电耦联（electric coupling）也称离子耦联（ionic coupling），其连接子是一种离子通道，带电的离子能通过间隙连接到达相邻细胞。

在兴奋性组织的细胞之间，均广泛存在电耦联现象，如电耦联使心肌细胞同步收缩和舒张，若这种连接破坏电耦联消失，则心脏停止跳动；成年动物大多数平滑肌细胞仅有少数平滑肌受神经支配，其兴奋传导主要靠间隙连接，小肠平滑肌细胞通过电耦联，使收缩和蠕动同步化；神经细胞通过电耦联使动作电位从一个细胞扩散传导至另一个细胞，速度

快而准确；某些上皮细胞通过间隙连接使纤毛协调运动。总之，细胞通过小的代谢分子或带电离子的分配，提供一种协调细胞组织功能活动机制。

（二）化学突触主要存在于神经细胞之间和神经细胞与肌细胞的接触部位

在电兴奋性细胞之间除了通过电突触进行冲动传导外，还可以通过化学突触传递冲动信号。化学突触主要存在于神经细胞与神经细胞之间以及神经细胞与肌细胞之间的接触部位。在化学突触处，传递和接受信号的细胞分别为突触前和突触后细胞，它们的质膜之间有 20nm 宽的突触间隙，使电信号不能通过。为了使信号从突触前细胞传递到突触后细胞，电信号要转化成化学信号分子——即神经递质，由突触前细胞释放到突触间隙内。当神经递质与突触后细胞上相应受体结合后，可导致突触后细胞膜电位发生变化，引起突触后细胞产生动作电位。

第二节　细胞黏附分子与细胞粘连

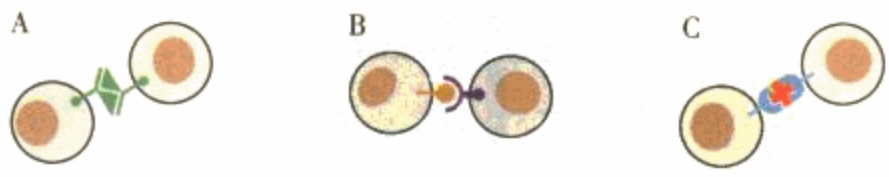
细胞黏附分子（cell adhesion molecule，CAM）是广泛存在于细胞膜上的一类跨膜糖蛋白，是介导细胞与细胞之间、细胞与细胞外基质之间相互结合并起黏附作用的一类细胞表面分子。目前已发现的细胞黏附分子达百余种，根据其分子结构特点和作用方式，可分为四大类：钙黏素（Cadherin），选择素（Selectin），免疫球蛋白超家族（Ig-superfamily，Ig-SF）及整联蛋白家族。细胞黏附分子多数需要依赖于二价阳离子 Ca^{2+}或 Mg^{2+}才起作用，这些分子介导的细胞识别与黏着还能在细胞骨架的参与下，形成桥粒、半桥粒、黏合带以及黏着斑等锚定连接结构（表 10-2）。

表 10-2　细胞表面主要黏附分子家族

黏附分子类型	主要成员	Ca^{2+}/Mg^{2+}依赖性	在胞内相连的细胞骨架成分	与细胞连接关系
介导细胞与细胞连接				
钙黏蛋白	E, N, P-钙黏蛋白	+	肌动蛋白纤维	黏合带
	桥粒-钙黏蛋白	+	中间纤维	桥粒
选择素	P-选择素	+		-
免疫球蛋白类	神经细胞黏附分子	-		-
血细胞整联蛋白	$\alpha_L\beta_2$	+	肌动蛋白纤维	-
介导细胞与细胞外基质连接				
整联蛋白	20 多种类型	+	肌动蛋白纤维	黏着斑
	$\alpha_6\beta_4$	+	中间纤维	半桥粒

细胞黏附分子均为跨膜糖蛋白，由三部分组成：①较长的胞外区，肽链的 N 端部分带有糖链，是与配体识别的部位；②跨膜区，多为一次跨膜的疏水区；③胞质区，肽链的 C 端部分，一般较小，可与质膜下的细胞骨架成分或与胞内的信号传导分子结合，从而介导细胞之间及细胞与细胞外基质之间的黏附。

细胞黏附分子通过三种方式介导细胞识别与黏着（图 10-10）：①同亲型结合（homophilic binding）即相邻细胞表面的同种黏附分子间的相互识别与黏着，钙黏素主要以这种方式介导细胞黏附；②异亲型结合（heterophilic binding）即两相邻细胞表面的不同种黏附分子间的相互



●图 10-10　细胞间黏附的三种方式

A. 同亲型结合　B. 异亲型结合

C. 连接分子依赖性结合

识别与黏着，选择素和整联蛋白主要以这种方式介导细胞黏附；③连接分子依赖性结合（linker-dependent binding）即相邻细胞黏附分子通过连接分子中介才能相互识别与黏着。

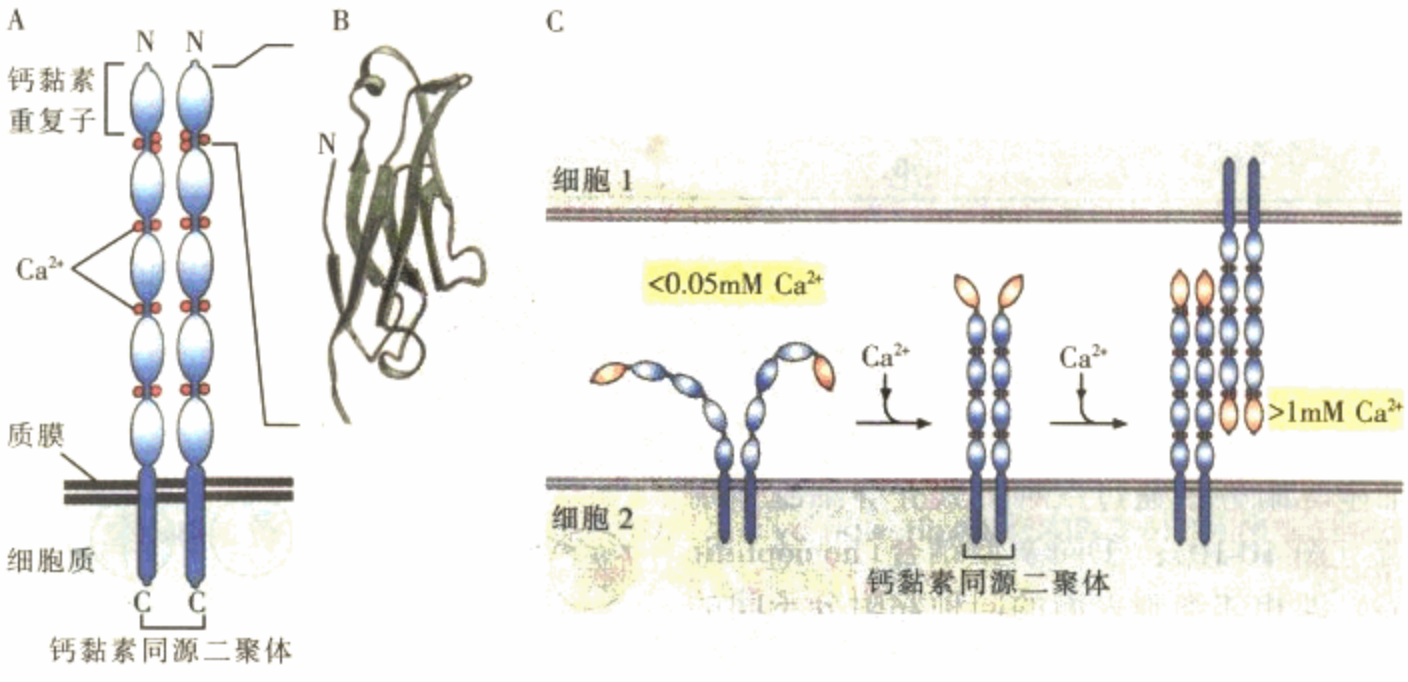
一、钙黏素家族

钙黏素也称钙黏蛋白，是一类依赖于 Ca^{2+}的同亲型细胞黏附分子，它们在胚胎发育中的细胞识别、迁移和分化以及组织器官的构筑中起重要作用。钙黏素是一个大的糖蛋白家族，不同种类的细胞以及发育不同阶段，其细胞表面的钙黏素的种类与数量有所不同。至今已鉴定出 50 余种，分布于不同的组织中（表 10-3）。常根据其最初发现的组织类型命名，如上皮组织中的钙黏素称 E-钙黏素（epithelial cadherin，E-cadherin）；神经组织中的钙黏素称 N-钙黏素（neural cadherin，N-cadherin）；胎盘、乳腺和表皮中的钙黏素称 P-钙黏素（placental cadherin，P-cadherin）和血管内皮细胞中的钙黏素称 VE-钙黏素（vascular endothelial cadherin，VE-cadherin）。

表 10-3　钙黏素家族部分成员

名称	主要分布	与细胞连接关系	在小鼠中失活后的表型
E-钙黏素	上皮细胞	黏合连接	胚泡细胞不能聚集在一起，死于胚泡时期
N-钙黏素	神经、心脏、骨骼肌及成纤维细胞	黏合连接及化学突触	因心脏缺陷而死于胚胎时期
P-钙黏素	胎盘、表皮	黏合连接	异常乳腺发育
VE-钙黏素	血管内皮细胞	黏合连接	血管异常发育（由于内皮细胞凋亡）

1. 钙黏素分子结构　大多数钙黏素分子为单次跨膜糖蛋白，由 700~750 个氨基酸残基组成，在质膜中常以同源二聚体的形式存在。钙黏素分子结构同源性很高，不同钙黏素之间有 50%~60%的氨基酸序列相同。胞外区约由 110 个氨基酸残基组成，常折叠成 5 个重复结构域，Ca^{2+}结合在重复结构域之间，可将胞外区锁定在一起形成棒状结构，赋予钙黏素分子刚性和强度。Ca^{2+}结合越多，钙黏素刚性越强。如果去除 Ca^{2+}，胞外区就变得松软，并可被蛋白酶水解（图 10-11），故在细胞培养时常用阳离子螯合剂 EDTA 破坏 Ca^{2+}或



●图 10-11　钙黏素的结构与功能

A. 一个经典钙黏素分子　B. 一个钙黏素重复子的三维结构　C. Ca^{2+}对钙黏素的影响

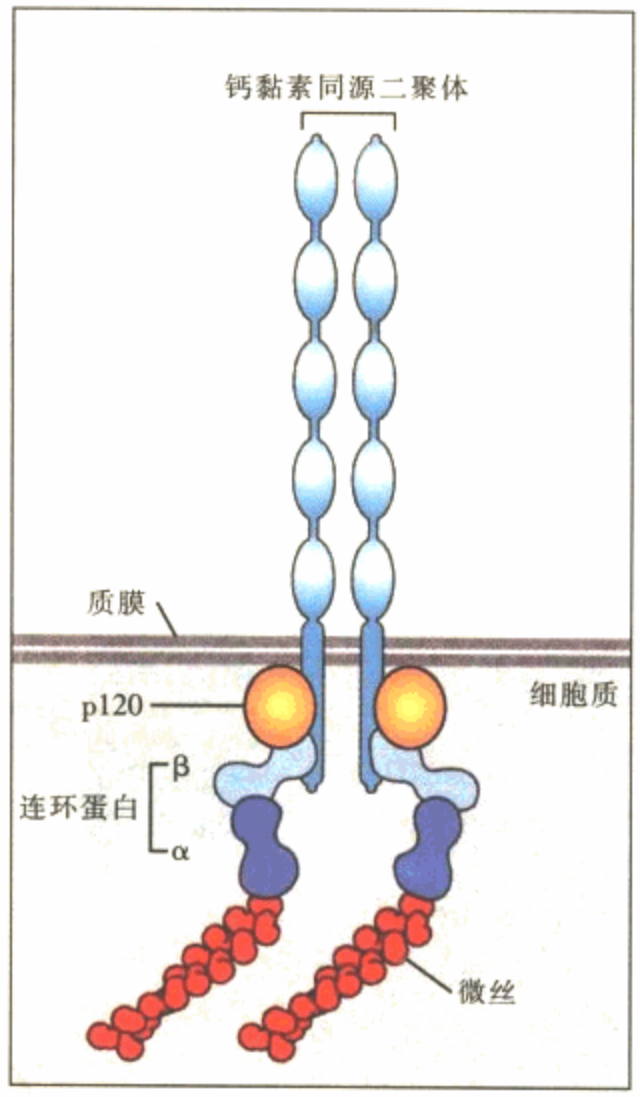
Mg^{2+}依赖性细胞黏着。钙黏素分子的胞内部分是高度保守的区域，可以通过附着蛋白与细胞骨架成分相连。

2. 钙黏素的功能

（1）介导细胞与细胞之间的同亲性细胞黏附：在胚胎和成人组织中，同类细胞需要具备自我标识与彼此黏附的特性，这一特性主要是由钙黏素分子在特定组织上的选择性表达所决定的。如 E-钙黏素就是保持上皮细胞相互黏合的主要细胞黏附分子，如果将编码 E-钙黏素的 DNA 转染至不表达钙黏素也无黏附作用的成纤维细胞，可使成纤维细胞之间发生 Ca^{2+}依赖性的同亲性细胞黏附，用抗 E-钙黏素抗体可以抑制这种黏附。

（2）在个体发育过程中影响细胞的分化，参与组织器官的形成：在个体发育过程中，细胞通过调控钙黏素表达的种类与数量而决定胚胎细胞间的相互作用（黏合、分离、迁移、再黏合），影响细胞的分化，参与组织器官的形成。如 E-钙黏素在胚胎发育进入 8 细胞卵裂时期就开始表达，使松散的分裂球细胞紧密黏合。胚胎进一步发育，某些胚层的细胞停止表达 E-钙黏素而表达其他钙黏素。如神经系统发育形成神经管时，神经细胞表达N-钙黏素。近年来在神经系统发现一个独特的钙黏素家族，称为原钙黏素（proto-cadherin），它们携带介导突触连接分子密码，对于神经元识别靶细胞并建立起正确的突触联系起重要的作用。

（3）参与细胞之间稳定的特化连接结构：在锚定连接中，钙黏素胞内区通过细胞内附着蛋白 α-和 β-连环蛋白（catenin）与肌动蛋白纤维相连，形成细胞之间牢固连接的黏合带；在桥粒结构中，钙黏素胞内区通过附着蛋白构成的胞质斑与中间纤维相连（图 10-12）。另外，一些钙黏素在锚定连接形成过程中起调节信号的传递作用。如 VE-钙黏素不仅介导内皮细胞间的黏附，还作为血管内皮生长因子的辅助受体，将信号传递到细胞内。



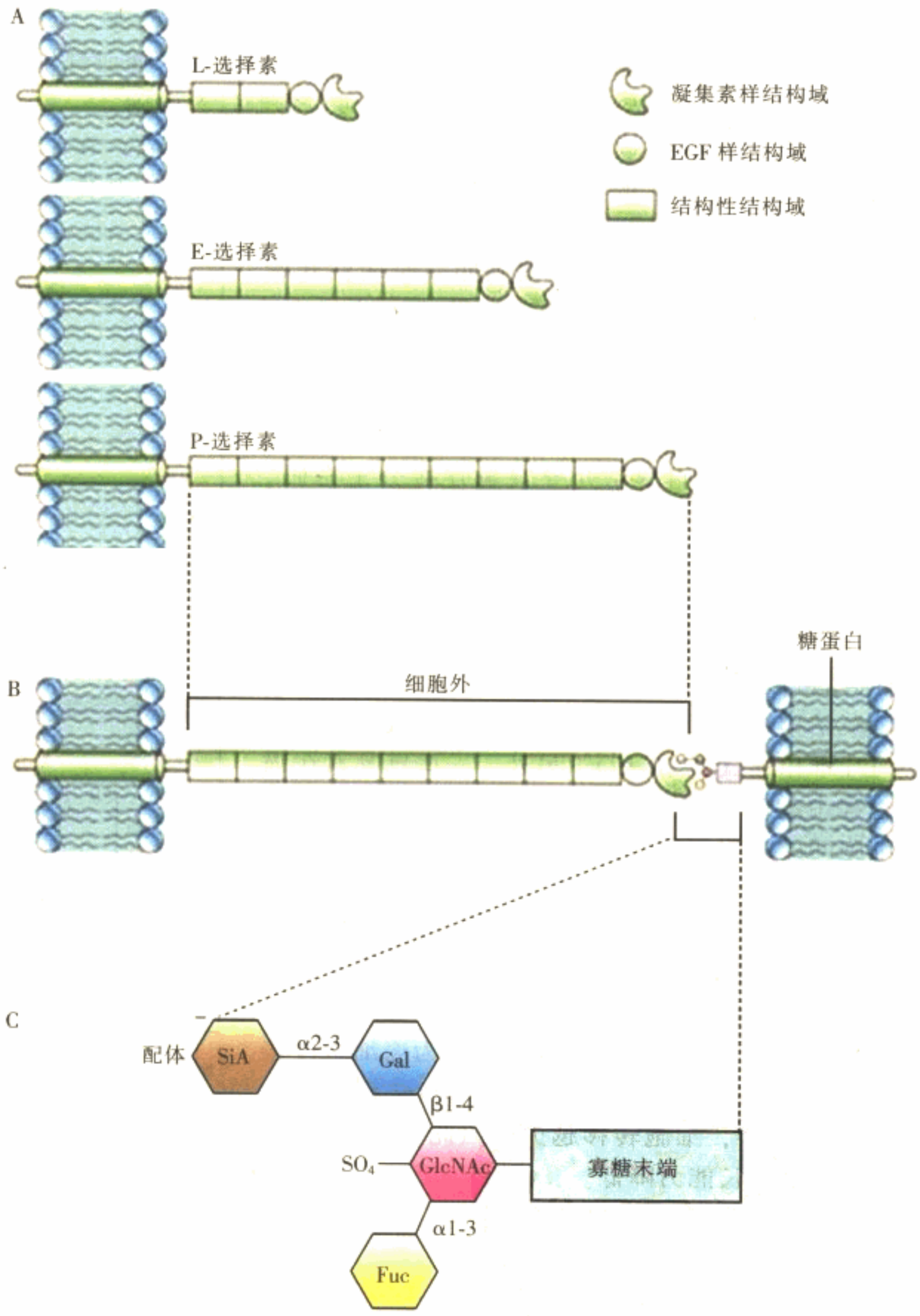
●图 10-12　钙黏素通过附着蛋白与微丝结合

3. 钙黏素与疾病　钙黏素功能的丧失在恶性肿瘤的扩散中起重要作用。缺失 E-钙黏素可导致上皮性肿瘤的发生。在上皮癌的研究中，很多种癌组织细胞表面的 E-钙黏素减少或消失，导致癌细胞容易从肿瘤组织中脱落，成为癌细胞侵袭与转移的前提。因而有人将 E-钙黏素视为细胞转移抑制分子，表达 E-钙黏素越多，细胞转移越少，因此，人为升高恶性肿瘤细胞中钙黏素的表达时，其在动物体内的生长能力降低。

二、选择素

选择素（selectin）是一类依赖于 Ca^{2+}的异亲型细胞黏附分子，它们能特异性地识别其他细胞表面寡糖链中的特定糖基，主要介导白细胞与血管内皮细胞或血小板的识别和暂时性黏附，帮助白细胞、血小板从血液进入炎症部位。选择素家族包括 3 种成员：L-选择素最早在淋巴细胞上作为归巢受体被发现，后来发现在各种白细胞上都表达；P-选择素存在于血小板及内皮细胞的储存颗粒中，细胞活化后可在数分钟内转运至细胞表面；E-选择素，存在于内皮细胞，细胞活化后合成并转运至细胞表面。

1. 选择素的分子结构　选择素是单次跨膜糖蛋白，其胞外区由三个独立的结构域组成：即 N-末端的凝集素（lectin）结构域、表皮生长因子（EGF）样结构域以及与补体结合蛋白同源的结构域（图 10-13）。N-末端凝集素结构域是识别特异糖基，参与细胞之间



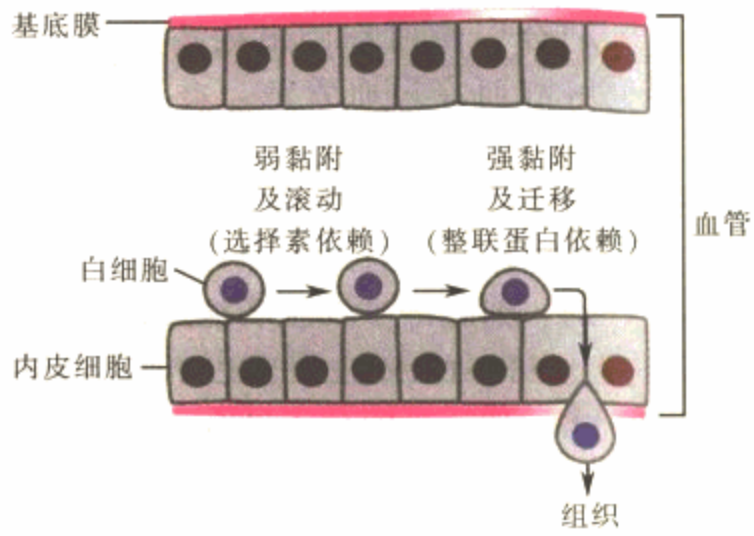
●图 10-13　3 种已知选择素的结构示意图

A. 示 3 种选择素的结构　B. 这 3 种选择素都能够识别糖蛋白寡糖链末端的糖基配体并与之结合

C. 示糖基配体的详细结构

选择性黏附的重要活性部位。所有 3 种选择素均可识别一类特定的糖基，Ca^{2+}参与该识别黏附过程。表皮生长因子和补体结合蛋白结构域具有加强分子间黏附以及参与补体系统调节等作用。选择素分子的胞内区可通过锚定蛋白与细胞内微丝结合。

2. 选择素的功能　主要功能是参与白细胞与血管内皮细胞或血小板的识别与黏着，帮助白细胞从血液进入炎症部位。在炎症发生部位，血管内皮表达 E-选择素，与白细胞和血小板上的寡糖链识别，由于选择素与寡糖链亲和力较小，加上血流速度的影响，白细胞在炎症部位的血管中黏附、分离，再黏附、再分离，呈现滚动方式运动，随后激活了自身整联蛋白，由后者介导白细胞与血管内皮细胞较紧密地结合在一起，并使白细胞经内皮细胞间隙迁移至组织（图 10-14）。

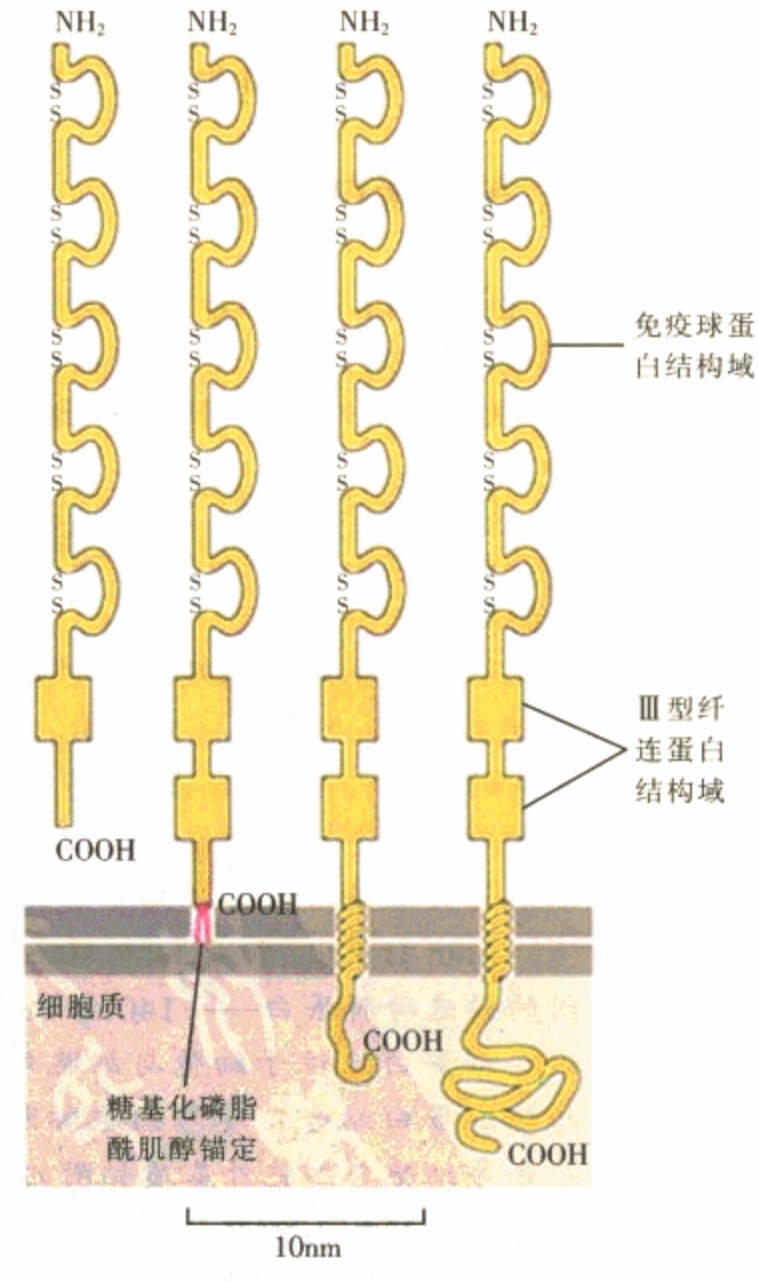


●图 10-14　选择素及整联蛋白介导白细胞迁移

三、免疫球蛋白超家族

免疫球蛋白超家族（immunoglobin-superfamily，Ig-SF）是一类分子结构中含有类似免疫球蛋白结构域、不依赖 Ca^{2+}的细胞黏附分子。这类分子的胞外区由一个或多个免疫球蛋白（Ig）样结构域组成。每一个 Ig 结构域都是由 90~110 个氨基酸残基形成的紧密折叠结构，其间有二硫键相连接。Ig-SF 成员复杂，包括多个黏附分子家族，其中有的介导同亲型细胞黏着，如各种神经细胞黏附分子（neural cell adhesion molecule，N-CAM）及血小板-内皮细胞黏附分子（PE-CAM）；有的介导异亲型细胞黏着，如细胞间黏附分子（I-CAM）及血管细胞黏附分子（V-CAM）等。大多数 Ig-SF 黏附分子介导淋巴细胞和免疫应答所需要的细胞（巨噬细胞、其他淋巴细胞和靶细胞）之间的特异的相互作用。但一些Ig-SF 成员，如 N-CAM 介导非免疫细胞的黏着。

1. Ig-SF 黏附分子的功能　目前了解最多的是 N-CAM，这是一类表达于神经细胞的 Ig-SF 黏附分子成员，由单一基因编码，mRNA 的选择性剪接及糖基化的不同形成了 20 余种不同的 N-CAM，其配体也为 N-CAM。分析发现，所有 N-CAM 的胞外区都有 5 个免疫球蛋白样的结构域，它们通过同亲型黏着机制与相邻细胞同类分子结合黏附在一起，与神经系统的发育、轴突的生长和再生以及突触的形成密切相关（图 10-15）。N-CAM 的基因缺陷可引起智力发育迟缓和其他神经系统病变。



●图 10-15　神经细胞黏附分子的结构

4 种神经细胞黏附分子免疫球蛋白结构域，每个结构域在环末端形成二硫键

一些 Ig-SF 成员通过异亲型细胞黏着机制参与细胞黏附，例如，V-CAM 是一类表达于血管细胞的Ig-SF 黏附分子成员，可与白细胞表面的 $\alpha_4\beta_1$ 整联蛋白（其配体）相结合，使白细胞沿内皮滚动并固着于炎症部位的血管内皮，发生铺展，进而分泌水解酶而穿过血管壁。

I-CAM 是另一组 Ig-SF 黏附分子，有多种类型，不同的 I-CAM 在体内分布范围有较大的差异。内皮细胞的 I-CAM 也可通过与白细胞表面的整联蛋白分子结合，在炎症反应中发挥作用。有的类型只在 T 细胞、单核细胞和中性粒细胞表达。I-CAM 在淋巴系统抗原识别、细胞毒 T 细胞功能发挥以及淋巴细胞的募集方面起重要作用。

PE-CAM 主要表达于血小板和内皮细胞，既可以同亲型黏着方式又可以异亲型黏着方式与其他黏附分子结合，在血管内皮细胞的紧密黏附中起主要作用。

2. Ig-SF 黏附分子与医学　NCAM-L1（神经细胞黏附分子-L1）是 Ig-SF 黏附分子成员，主要在神经细胞中表达，与神经元之间黏附以及相互作用有关。在胎儿酒精综合症（fetal alcohol syndrome，FAS）研究中，揭示了神经发育过程中 NCAM-L1 的重要作用，在一定酒精浓度存在情况下，酒精可与 NCAM-L1 结合，致使胚胎小脑细胞之间丧失了相互识别和黏附的能力，因此母亲孕期大量饮酒的新生儿出现精神异常和颜面畸形。遗传疾病 *NCAM-L1* 基因突变个体与 FAS 的个体具有相似表型。

研究表明 I-CAM、V-CAM 和 PE-CAM 在免疫排斥反应中具有重要作用。I-CAM 介导了肿瘤细胞与白细胞的黏附，肿瘤细胞上的 I-CAM 的表达降低可能与肿瘤细胞逃逸免疫监视有关。在 I-CAM 缺失的小鼠中出现炎症反应缺陷。

四、整联蛋白家族

整联蛋白又称整合素，是一类普遍存在于脊椎动物细胞表面，依赖于 Ca^{2+}或 Mg^{2+}的异亲型细胞黏附分子，介导细胞和细胞之间以及细胞与细胞外基质之间的相互识别和黏附，具有联系细胞外部作用因素与细胞内部结构（细胞骨架）的功能。

经典实验：整联蛋白的发现

研究背景

细胞与细胞外基质黏附作用的分子基础一直受到细胞生物学家的关注。20 世纪 70 年代末到 80 年代初，包括 Richard O. Hynes 实验室在内的一些研究工作发现，在细胞骨架的应力纤维（stress fiber）与细胞外基质中的纤连蛋白之间存在一种物理性的连接，并发现有多个细胞骨架蛋白（包括纽蛋白和踝蛋白）参与其中，但是连接细胞与细胞外基质的关键性跨膜蛋白尚不清楚。

Alan Horwitz 和 Clayton Buck 等人利用自制的抗体筛选出参与细胞和细胞外基质黏附的候选跨膜蛋白——140kD 大小的跨膜糖蛋白复合体。免疫荧光和免疫电镜检测发现这些糖蛋白定位于细胞与细胞外基质的黏附部位。另有研究表明 140kD 糖蛋白复合体与纤连蛋白结合，参与细胞黏附。这些结果提示，这个 140kD 的糖蛋白复合体很可能是介导细胞与细胞外基质黏附的关键性跨膜蛋白。但该糖蛋白复合体的编码基因及其蛋白结构特征均不清楚。Hynes 实验室人员利用抗体杂交技术，筛选到了这种糖蛋白复合体的编码基因，并对其进行了进一步的鉴定。

实验内容

他们应用可以在大肠杆菌中转录和翻译真核细胞 cDNA 插入片段的 λ 噬菌体表达载

体，利用鸡胚成纤维细胞的 mRNA 构建出 cDNA 文库。这个 cDNA 文库包含约 100 000 个独立的 cDNA 插入片段，可以充分代表在鸡胚成纤维细胞内表达的所有 mRNA。然后，利用 140kD 糖蛋白复合体的抗体去筛选这个文库，获得了若干携带特定 cDNA 插入片段的噬菌体重组体。抗体杂交反应显示，这些克隆（噬菌体重组体）所表达的蛋白可以与 140kD 糖蛋白复合体的抗体结合。

接下来的问题是确定噬菌体重组体中的 cDNA 是否确实编码了 140kD 糖蛋白复合体中的某种蛋白成分。他们利用筛选出的噬菌体克隆来表达蛋白，并将表达后的蛋白注射给兔子，进行免疫，使之产生特异性的抗体。免疫印迹实验显示，该抗体可以识别筛选到的噬菌体重组体中的 cDNA 所编码的蛋白，并能识别鸡胚成纤维细胞上 140kD 糖蛋白复合体中的某种蛋白；此外，利用该抗体对细胞进行免疫荧光检测发现，阳性染色部位均位于应力纤维与细胞外基质相连的部位，这与用原来的 140kD 糖蛋白复合体的抗体进行染色的结果相似。因此，免疫印迹和免疫荧光的结果都说明，筛选得到的 cDNA 克隆编码了 140kD 糖蛋白复合物中的某种蛋白。

接着，他们对该段 cDNA 进行测序，并由此推断其编码的氨基酸序列，发现该段 cDNA 编码了一个由 803 个氨基酸组成的蛋白质。此蛋白包含一个位于氨基端的信号序列，以及一个位于羧基端的由 23 个疏水氨基酸构成的跨膜 α-螺旋。对氨基酸序列的进一步分析显示，该蛋白可能存在一个短的胞内结构域和一个长的含有多个糖基化位点的胞外结构域，这些都符合推测的跨膜糖蛋白的结构。

发表论文

John W. Tamkun, Douglas W. DeSimone, Deborah Fonda, Ramila S. Patel, Clayton Buck, Alan F. Horwitz and Richard O. Hynes (Massachusetts Institute of Technology Cambridge, Massachusetts, USA):

Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. Cell, 1986, 46 : 271-282

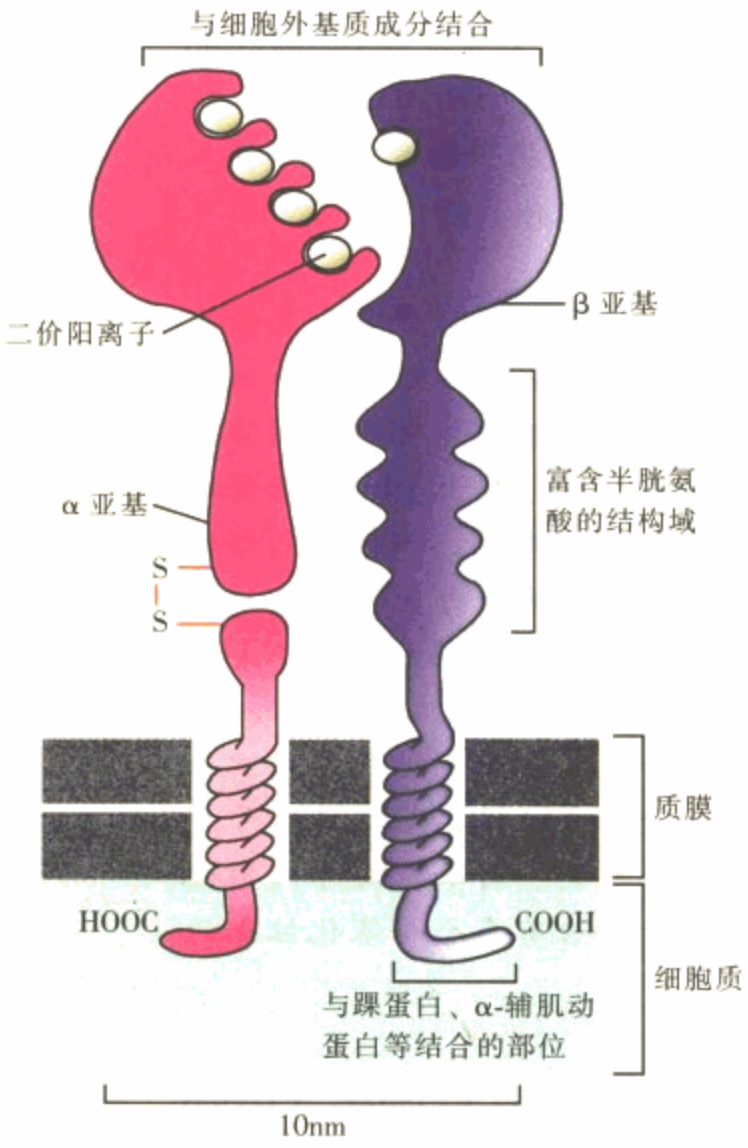
后续影响

Hynes 和他的同事由此得出结论，即克隆得到了一种将细胞外基质的纤连蛋白同细胞骨架连接在一起的跨膜蛋白的编码基因。他们将这种蛋白命名为整联蛋白（integrin），“以表明它能够作为一种与细胞膜整合的复合体，参与细胞外基质和细胞骨架间的跨膜联系”。

对整联蛋白基因的克隆推动了对构成细胞连接的分子基础的认识。在黏着斑处，整联蛋白将细胞外基质和肌动蛋白丝连接起来。此外，整联蛋白还介导了上皮细胞通过半桥粒与细胞外基质的黏附（整联蛋白在半桥粒处将细胞外基质与细胞的中间纤维连接起来）。因此，正如 Hynes 和他的同事所展示的，整联蛋白在细胞-细胞外基质的黏附过程中发挥着广泛的作用。后续研究表明，整联蛋白也在细胞的信号转导过程中发挥重要作用，通过将细胞外的信号传递至细胞内，来调控细胞的运动、增殖和存活等。因此，整联蛋白的发现不但拓展了人们对细胞-细胞外基质黏附的认识，也提出了一种崭新的细胞行为的调控机制。

1. 整联蛋白是由 α 和 β 两个亚基形成的异二聚体跨膜蛋白　目前至少已鉴定出人有 24 种不同的 α 亚基和 9 种不同的 β 亚基，它们相互组合成不同的整联蛋白，可与不同的配体结合。

整联蛋白 α 和 β 亚基均由胞外区、跨膜区和胞内区三个部分组成。由 α 和 β 亚基胞外区组成的球状头部区是整联蛋白分子与配体结合部位；胞内区很短，只含有 30~50 个氨



●图 10-16　整联蛋白的结构

基酸，可通过胞内的一些连接蛋白（踝蛋白、α-辅肌动蛋白、Filamin、纽蛋白等）与细胞内的肌动蛋白丝等细胞骨架成分相互作用（图 10-16）。整联蛋白的胞外区可以通过自身结构域与纤连蛋白、层粘连蛋白、胶原等含有 Arg-Gly-Asp（RGD）三肽序列的细胞外基质成分结合（表 10-4），从而介导细胞与细胞外基质的黏着，典型结构有黏着斑和半桥粒。从表 10-4 可以看出，不同细胞表达的整联蛋白在组成上不尽相同；此外，不仅同一种整联蛋白可以与一种以上的不同配体相结合；而且，同一种配体也可以与多种不同的整联蛋白相结合。

2. 整联蛋白的功能

（1）整联蛋白介导细胞间相互作用：在一些细胞表面有与整联蛋白结合的特异性配体（如 Ig 超家族成员），可以介导细胞间的反应。如由 β_2 亚基组成的整联蛋白能使白细胞在感染部位的血管内皮细胞上黏附，白细胞由此得以迁移出血管进入炎症部位。β_3 亚基组成的整联蛋白见于血小板和其他类型的细胞，可以介导血小板的黏附，参与凝血过程。

（2）整联蛋白介导细胞与细胞外基质间的相互作用：由 β_1 亚基组成的整联蛋白为细胞外基质蛋白的受体，其胞外区具有与大多数细胞外基质蛋白，如蛋

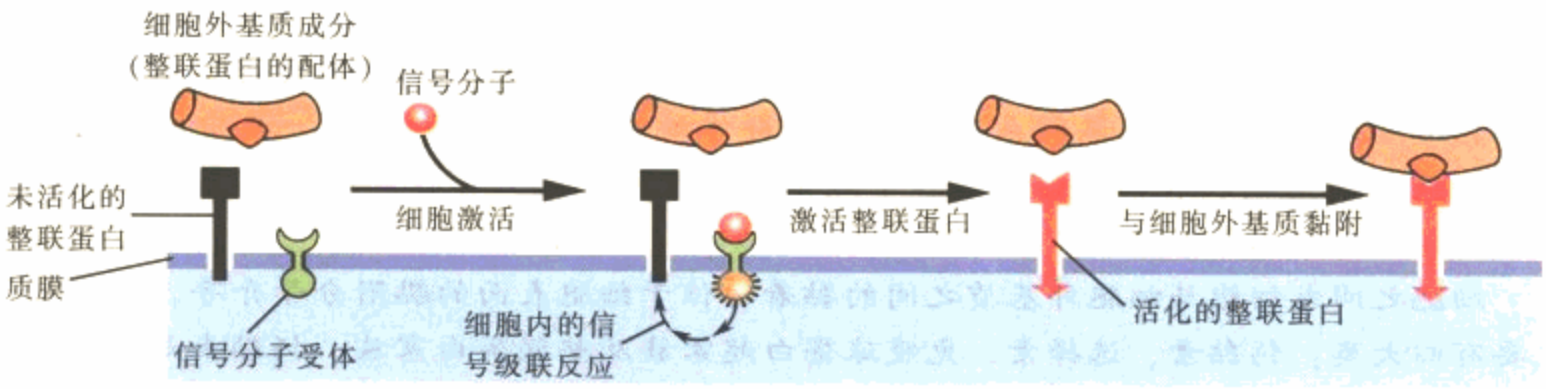
表 10-4　常见的几种整联蛋白及其配体

整联蛋白的亚单位组成	主要的细胞分布	配　体
$\alpha_1\beta_1$	多种细胞类型	胶原，层粘连蛋白
$\alpha_2\beta_1$	多种细胞类型	胶原，层粘连蛋白
$\alpha_4\beta_1$	造血细胞	纤连蛋白，VCAM-1
$\alpha_5\beta_1$	成纤维细胞	纤连蛋白
$\alpha_L\beta_2$	T 淋巴细胞	ICAM-1，ICAM-2
$\alpha_M\beta_2$	单核细胞	血纤维蛋白原，ICAM-1
$\alpha_{IIb}\beta_3$	血小板	血纤维蛋白原，纤连蛋白
$\alpha_6\beta_4$	上皮细胞	层粘连蛋白

白聚糖、纤连蛋白、层粘连蛋白等含有 RGD 三肽序列结合的位点，因此可以使细胞黏着于细胞外基质上。一般来说，整联蛋白与其配体结合的亲和性不很高，而在细胞表面的数量较多，这种低亲和性有利于细胞调节其与细胞外基质成分结合的牢固程度与可逆性结合，细胞可通过膜上这类受体与细胞外基质成分结合、分离、再结合、再分离，从而进行迁移。

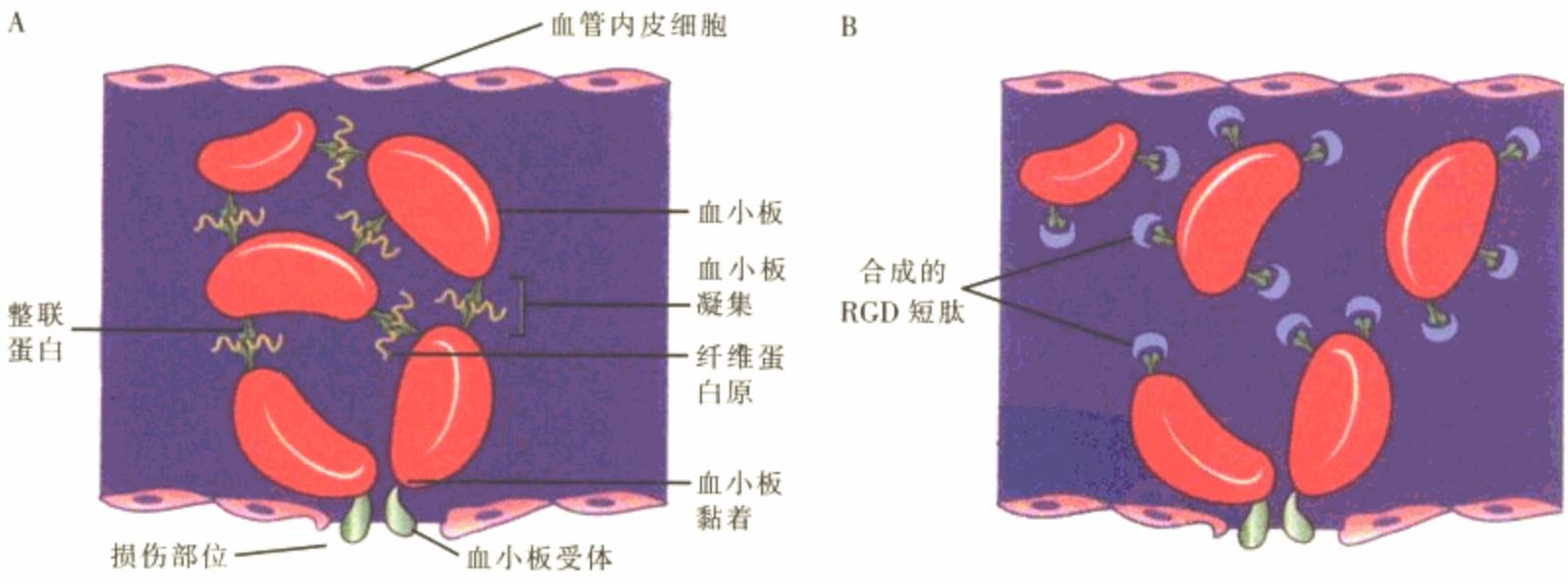
（3）整联蛋白在信号传递中发挥重要作用：整联蛋白与其配体结合后聚集成簇，不但借以形成稳定、牢固的结合，并可启动信号转导。整联蛋白胞外结构域与细胞外基质之间相互作用可以产生各种各样的信号，包括 Ca^{2+}向胞质的释放、磷酸肌醇第二信使的合成和细胞内蛋白质酪氨酸的磷酸化等，从而调节细胞的运动、生长、增殖、分化和存活等基本生命活动。整联蛋白与其配体的结合受到精确的调控。在一些情况下，细胞外的信号激活

细胞内的级联信号分子，改变整联蛋白的构象使之胞外区能够与其相应的配体结合，从而介导细胞间的黏附，但是具体的机制目前并不清楚，可能是整联蛋白胞内区末端发生磷酸化，或者是与胞浆内的活化分子相互作用的结果。这种能够从细胞内部控制整联蛋白与配体结合的方式称为“胞内信号外传”(inside-out signaling)，这对于血小板和白细胞介导的黏附反应是非常重要的（图 10-17）。



●图 10-17　细胞内部信号可以调控整联蛋白与配体的结合

3. 整联蛋白与医学　整联蛋白胞外区可以通过自身结构域识别含有 RGD 的三肽序列的配体，体外实验证实，人工合成肽的 RGD 序列可以竞争性阻断细胞与纤连蛋白的结合，使培养的细胞不能贴壁生长。据估计大约半数的整联蛋白含有结合 RGD 的结构域。RGD 序列的发现开辟了以受体-配体相互作用为基础的新的治疗疾病的手段。血栓的形成是造成心脏病发作的病因之一。血凝块的形成始于血小板的凝聚，由血小板特异的整联蛋白 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 与血浆中含有 RGD 序列的纤维蛋白原结合，介导了血小板的凝聚（图 10-18）。动物实验表明，含有 RGD 序列的人工合成肽可以竞争性地阻止血小板整联蛋白与血浆中纤维蛋白原结合，从而预防血凝块的形成。这一发现使人们设计出一种新的非肽类抗凝血药物（如 Aggrastat），它们类似于 RGD 结构，但只与血小板整联蛋白结合。此外，一种直接抗整联蛋白的特异性抗体（称为 ReoPro），能阻止接受血管外科手术患者的血凝块形成。



●图 10-18　血小板整联蛋白与纤维蛋白原结合介导血小板相互黏附

A. 血小板整联蛋白活化后与纤维蛋白原结合形成血凝块　B. 用合成的 RGD 短肽抑制血小板凝聚

小结

多细胞生物相邻细胞之间或细胞与细胞外基质之间在质膜上分化出的连接结构称为细胞连接。细胞连接可分为封闭连接、锚定连接和通讯连接三种类型。其中以紧密连接为代

表的封闭连接通过相邻质膜上的跨膜蛋白将细胞紧密连接在一起，封闭上皮细胞间隙，阻止细胞外物质通过细胞间隙进入组织，同时还隔离了膜蛋白和膜脂分子的侧向扩散，维持上皮细胞的极性；锚定连接分为两大类：一类与肌动蛋白纤维相连的黏合连接，在相邻细胞之间形成黏合带，在细胞与细胞外基质间形成黏着斑；另一类由中间纤维参与的桥粒连接，在相邻细胞之间形成桥粒，细胞与细胞外基质间形成半桥粒。它们将相邻细胞或细胞与细胞外基质连接在一起，形成抵抗机械张力的牢固连接，并在组织器官的形成和细胞的迁移等过程中发挥重要作用；通讯连接在相邻细胞膜上存在特殊的连接通道，以实现细胞间电信号和化学信号的通讯联系，从而完成群体细胞间的合作和协调。其中间隙连接在细胞之间的代谢耦联和信号传递过程中起重要作用，在电兴奋性细胞之间还可以通过化学突触传递冲动信号。

细胞之间或细胞与细胞外基质之间的黏着由位于细胞表面的黏附分子介导。黏附分子主要有四大类：钙黏素、选择素、免疫球蛋白超家族及整联蛋白家族。钙黏素是一类依赖于Ca^{2+}的同亲型细胞黏附分子，对胚胎发育中的细胞识别、迁移和组织分化以及组织器官的构筑起重要作用；选择素是一类依赖于Ca^{2+}的异亲型细胞黏附分子，它们能特异识别其他细胞表面寡糖链中的特定糖基，主要参与白细胞与血管内皮细胞或血小板的识别和暂时性黏附，帮助白细胞、血小板从血液进入炎症部位；免疫球蛋白超家族是分子结构中含有类似免疫球蛋白结构域、不依赖Ca^{2+}的细胞黏附分子，大多介导淋巴细胞和免疫应答所需要的细胞之间的黏着，而 N-CAM 和 NCAM-L1 则介导非免疫细胞的黏着，在神经系统发育中有重要作用；整联蛋白普遍存在于脊椎动物细胞表面，依赖于Ca^{2+}或Mg^{2+}的异亲型细胞黏附分子，介导细胞间以及细胞与细胞外基质之间的相互识别和黏着，同时整联蛋白还具有信号转导作用，调节细胞的运动、增殖、生长、生存、凋亡等重要生命活动。

（辛　华）

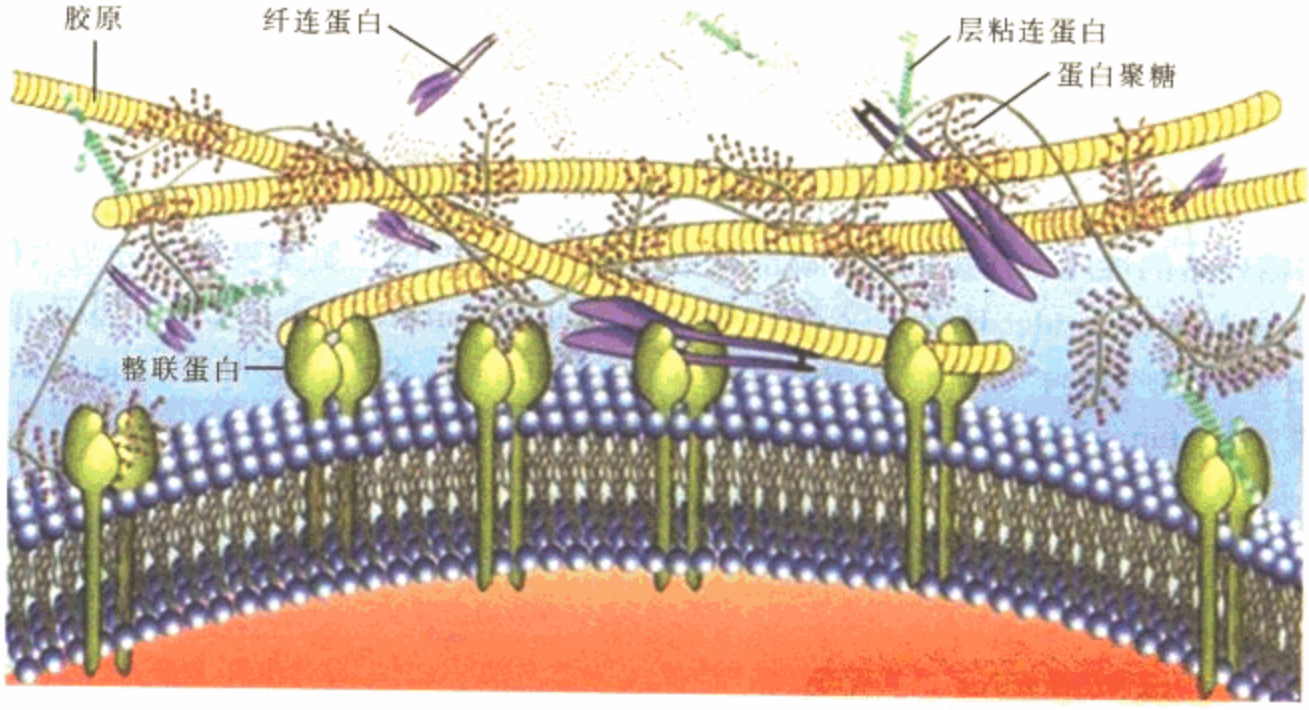
第十一章　细胞外基质及其与细胞的相互作用

机体的组织由细胞与细胞外基质（extracellular matrix，ECM）共同组成。细胞是生命活动的基本单位，而细胞外基质是由细胞分泌到细胞外空间，由细胞分泌蛋白和多糖构成的精密有序的网络结构。细胞通过细胞外基质行使多种功能，两者之间相互依存，使细胞与细胞、细胞与基底膜之间紧密联系，构成了各种组织与器官，使之成为一个完整有机整体。

研究证实，细胞外基质不仅对组织细胞起支持、保护、营养作用，而且还与细胞的增殖、分化、代谢、识别、黏着、迁移等基本生命活动密切相关。细胞外基质的结构和功能异常，与许多病理过程有关，如组织器官纤维化、肿瘤恶变、浸润以及组织创伤修复等，所以，在医学上细胞外基质与细胞同样具有重要意义。对于细胞外基质的研究，已经越来越引起人们的重视，成为细胞生物学领域的研究热点和前沿。

第一节　细胞外基质的主要组成成分

构成细胞外基质的大分子种类繁多，大致可分为三类：①氨基聚糖与蛋白聚糖；②胶原和弹性蛋白；③非胶原性黏合蛋白：纤连蛋白和层粘连蛋白（图 11-1）。



●图 11-1　细胞外基质成分及其细胞表面受体示意图

细胞外基质从结构表现形式上看，主要由凝胶样基质和纤维网架构成。氨基聚糖与蛋白聚糖构成凝胶样基质，纤维网架由起结构作用的胶原和弹性蛋白，以及起黏着作用的纤连蛋白和层粘连蛋白构成。

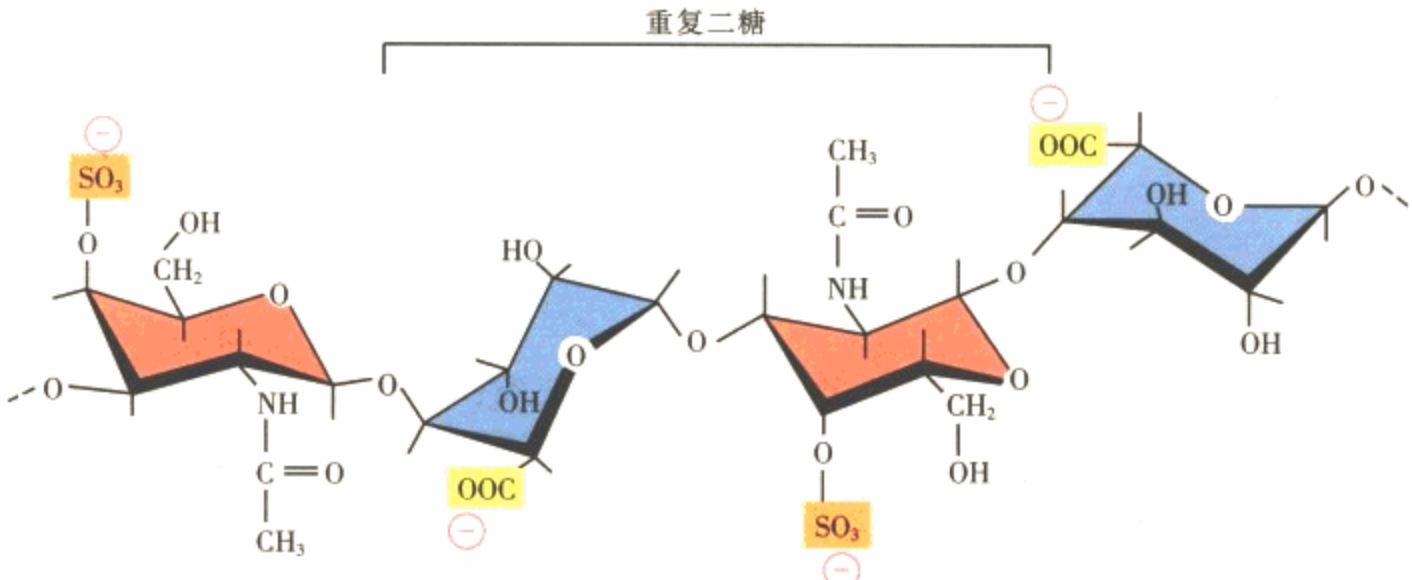
在动物组织中，细胞外基质的含量因组织种类不同而异，上皮组织、肌组织及脑与脊髓中的细胞外基质含量较少，而结缔组织中细胞外基质含量最大。细胞外基质的组分及组装形式由所产生的细胞决定，并与组织的特殊功能需要相适应。例如，角膜的细胞外基质为透明柔软的片层，肌腱则坚韧如绳索。细胞外基质不仅静态地发挥支持、连接、保水、保护等物理作用，而且动态地对细胞行为产生全方位的影响。

一、氨基聚糖与蛋白聚糖

氨基聚糖（glycosaminoglycan，GAG）与蛋白聚糖（proteoglycan，PG）是一些高分子量的含糖化合物，它们构成细胞外高度亲水性的凝胶，赋予组织具有良好的弹性和抗压性。

（一）氨基聚糖是由重复的二糖单位构成的直链多糖

氨基聚糖是由重复的二糖单位构成的直链多糖，过去称为黏多糖（mucopolysaccharide）。其二糖单位之一是氨基己糖（N-乙酰氨基葡萄糖或N-乙酰氨基半乳糖），故得名氨基聚糖；二糖单位中另一个糖残基多为糖醛酸（葡萄糖醛酸或艾杜糖醛酸）。因糖残基上带有羧基，故氨基聚糖呈强负电性（图11-2）。



●图11-2　硫酸皮肤素GAG链的二糖重复序列

根据糖残基的性质、连接方式、硫酸化数量和存在的部位，氨基聚糖可分为六种：①透明质酸（hyaluronic acid，HA）；②硫酸软骨素（chondroitin sulfate，CS）；③硫酸皮肤素（dermatan sulfate，DS）；④硫酸乙酰肝素（heparan sulfate，HS）；⑤肝素（heparin）；⑥硫酸角质素（keratan sulfate，KS）。其结构、特性及分布见表11-1。

表11-1　氨基聚糖的分子特性及组织分布

氨基聚糖	重复二糖单位	每个二糖单位所含硫酸基	组织分布
透明质酸	葡萄糖醛酸-N-乙酰氨基葡萄糖	0	结缔组织、皮肤、软骨、滑液、玻璃体
硫酸软骨素	葡萄糖醛酸-N-乙酰氨基半乳糖	0.2～2.3	软骨、角膜、骨、皮肤、动脉
硫酸皮肤素	葡萄糖醛酸或艾杜糖醛酸*-N-乙酰氨基半乳糖	1.0～2.0	皮肤、血管、心、心瓣膜
硫酸乙酰肝素	葡萄糖醛酸或艾杜糖醛酸*-N-乙酰氨基葡萄糖	0.2～3.0	肺、动脉、细胞表面
肝素	葡萄糖醛酸或艾杜糖醛酸*-N-乙酰氨基葡萄糖	2.0～3.0	肺、肝、皮肤、肥大细胞
硫酸角质素	半乳糖-N-乙酰氨基葡萄糖	0.9～1.8	软骨、角膜、椎间盘

注：* 艾杜糖醛酸是由差向异构酶催化糖链中的D-葡萄糖醛酸进行差向异构化而生成的

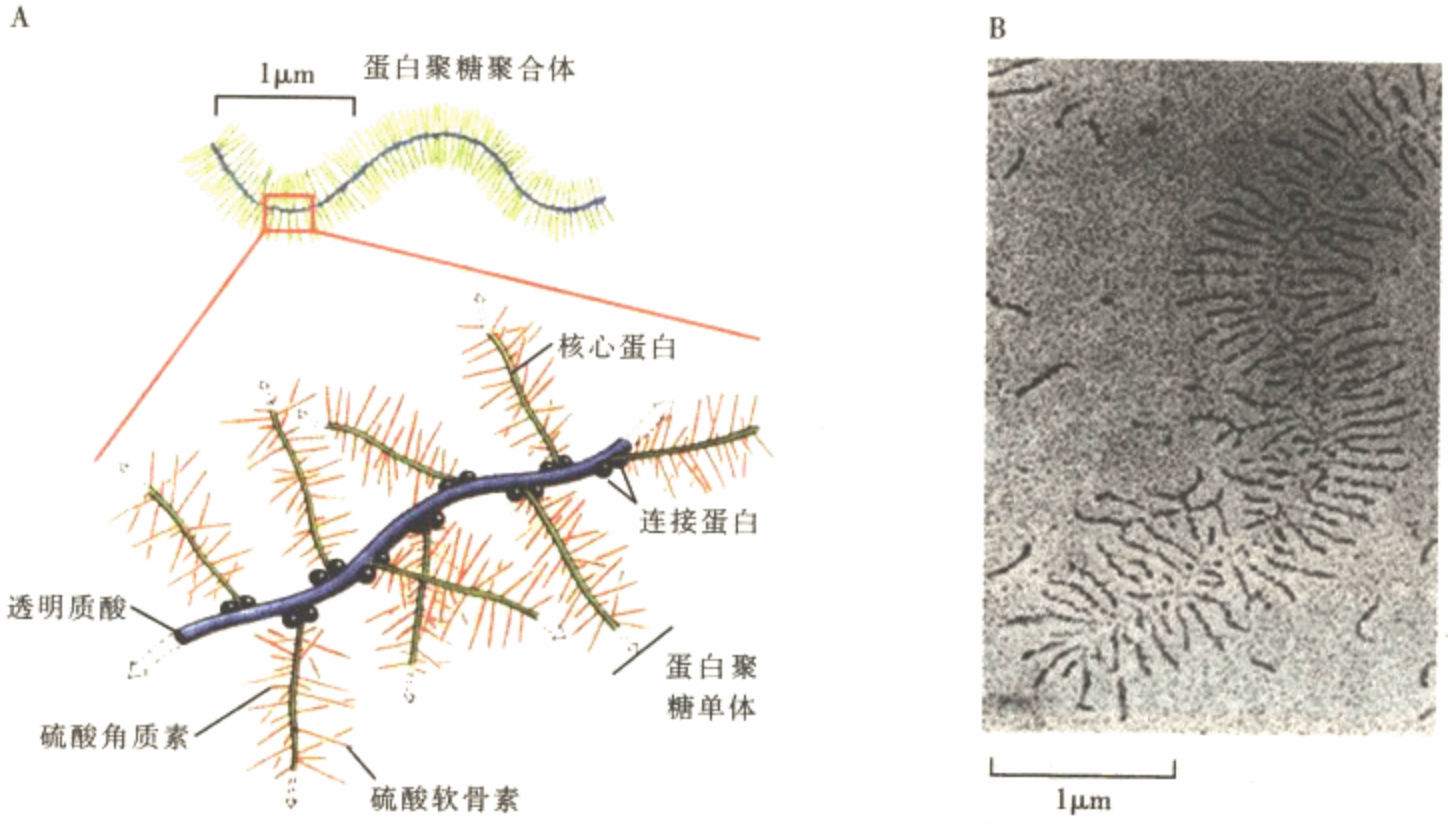
透明质酸是氨基聚糖中结构最简单的一种，其二糖单位为 N-乙酰氨基葡萄糖和葡萄糖醛酸。糖链由 5 000~10 000 个二糖重复单位重复排列构成，不发生硫酸化。由于透明质酸分子表面糖醛酸的羧基带有大量的负电荷，其相斥作用使整个分子伸展膨胀占据很大的空间；其表面的大量亲水基团，可结合大量水分子，使基质等渗性水肿，因而即使浓度很低，也能形成黏稠的胶体。如果没有约束，一个透明质酸分子可以占据 1 000 倍于其自身分子的空间。当处于有限空间时可产生膨胀压，赋予组织具有良好的弹性和抗压性。

透明质酸是一种重要的氨基聚糖，在胚胎发育早期和组织创伤修复时，细胞大量分泌透明质酸，促进细胞迁移和增殖。任务完成后，可被透明质酸酶降解。

（二）蛋白聚糖是由氨基聚糖和核心蛋白共价结合形成的高分子量复合物

1. 蛋白聚糖的分子结构　蛋白聚糖是由氨基聚糖（除透明质酸外）与核心蛋白（core protein）共价结合形成的高分子量复合物，是一种含糖量极高的糖蛋白（含糖量可达分子总重量的 95%）。核心蛋白为单链多肽，一条核心蛋白分子上可以连接 1~100 条以上相同或者不同的氨基聚糖（糖链较短，一般在 300 个糖基以下），形成蛋白聚糖单体。若干个蛋白聚糖单体通过连接蛋白（linker protein）以非共价键与透明质酸结合形成蛋白聚糖多聚体。

软骨中的蛋白聚糖复合体是已知的最巨大分子之一。它的氨基聚糖为硫酸软骨素和硫酸角质素，糖链数约 130 余条左右，分子量为 3×10^9，可使软骨具有良好的弹性和抗压性（图 11-3）。

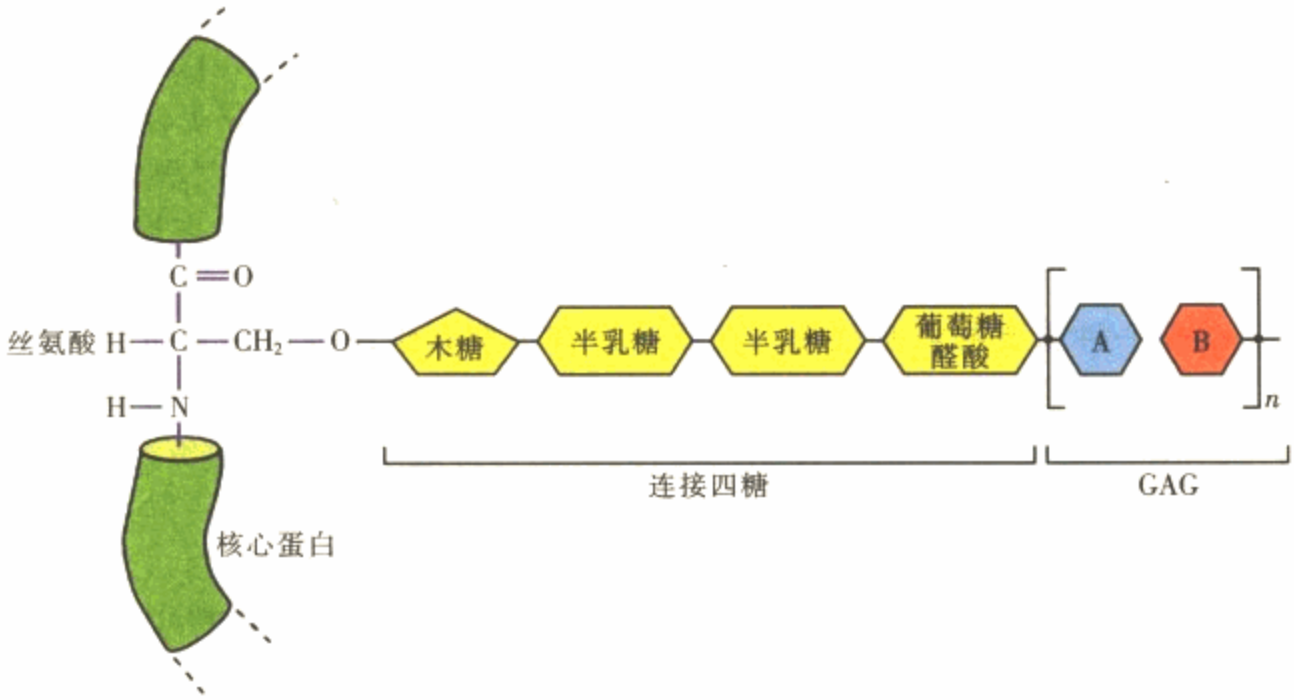


●图 11-3　细胞外基质中的蛋白聚糖

A. 细胞外基质中蛋白聚糖多聚体　B. 软骨中的蛋白聚糖电镜照片

2. 蛋白聚糖是在内质网中合成并装配的　蛋白聚糖的核心蛋白肽链在粗面内质网核糖体上合成，随后进入内质网腔装配上直链多糖。在装配时，一个专一的连接四糖（Xyl-Gal-Gal-GlcUA）首先结合到核心蛋白的丝氨酸残基上，在丝氨酸所处的肽链部位具有专一的构象，可被识别。然后在糖基转移酶（glycosyltransferases）的作用下，一个个糖基依次加接上去，形成了氨基聚糖糖链（图 11-4）。

蛋白聚糖的一个显著特点是其多态性，可以含有不同氨基酸序列的核心蛋白，以及长度和成分不同的多糖链。蛋白聚糖根据其主要的二糖单位命名（表 11-2）。



●图 11-4　蛋白聚糖中的GAG 链与核心蛋白的连接方式

蛋白聚糖由氨基聚糖与核心蛋白的丝氨酸共价连接，其中氨基聚糖通过一个连接四糖与核心蛋白相连

表 11-2　几种常见的蛋白聚糖

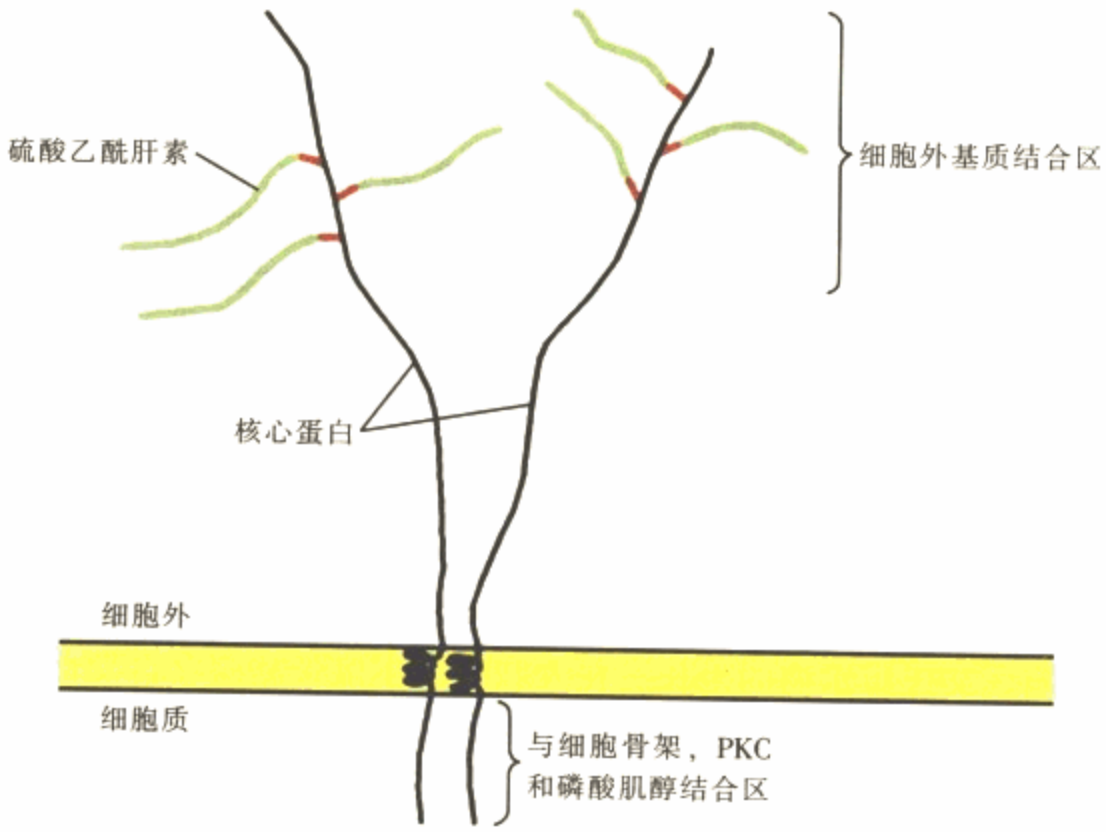
蛋白聚糖名称	核心蛋白分子量	GAG 链类型	GAG 链数目	分　布	功　能
聚集素（aggrecan）	210 000	硫酸软骨素 + 硫酸角质素	~130	软骨	机械支持；与透明质酸形成大的聚合体
乙聚糖（betaglycan）	36 000	硫酸软骨素/硫酸皮肤素	1	细胞表面和胞外基质	结合 TGF-β
装饰素（decorin）	40 000	硫酸软骨素/硫酸皮肤素	1	结缔组织	与Ⅰ型胶原原纤维和 TGF-β 结合
渗滤素（perlecan）	600 000	硫酸类肝素	2 ~ 15	基底膜	在基底膜中起过滤和结构作用
丝甘素（serglycin）	20 000	硫酸软骨素/硫酸皮肤素	10 ~ 15	血白细胞中的分泌泡	协助包装和贮存分泌分子
连接素-1（syndecan-1）	32 000	硫酸软骨素 + 硫酸类肝素	1 ~ 3	成纤维细胞和上皮细胞表面	细胞黏合；结合 FGF

蛋白聚糖并不都是细胞外基质成分，有的也是质膜的整合成分，如成纤维细胞和上皮细胞质膜中称为连接素（syndecan）的蛋白聚糖，核心蛋白以跨膜糖蛋白的方式嵌入质膜的脂双分子层中，胞外区连有硫酸软骨素和硫酸类肝素 GAG 糖链，可以与细胞外基质的胶原、纤连蛋白以及信号分子结合，胞内区肽段可与膜下细胞骨架相互作用，既可介导细胞与细胞外基质结合，又可使细胞内外信息相通（图 11-5）。

（三）氨基聚糖与蛋白聚糖的功能

氨基聚糖和蛋白聚糖普遍存在于动物体内各种组织中，在结缔组织中含量最高。其功能主要有以下几个方面：

1. 使组织具有弹性和抗压性　氨基聚糖和蛋白聚糖构成了细胞外高度水合的凝胶状基质，使组织具有渗透压和膨胀压，有抗张、反弹、抗机械压力的缓冲作用。在维持组织的形态，防止机械损伤中起重要作用。软骨中的蛋白聚糖巨大复合体，赋予软骨具有良好的



● 图 11-5　连接素 4 的结构示意图

各种连接素的细胞外区不同，但穿膜区和细胞内区均相同。细胞内区除和肌动蛋白丝相连外，尚可结合调节分子，在信号转导过程中发挥作用

弹性和抗压性。

2. 对物质转运有选择渗透性　由于糖基的高度亲水性和负电性，使糖链挺直交错，构成高度水化孔胶样物，孔的大小和电荷密度可调节对分子及细胞的通透性，具有分子筛的作用。水、离子和各种营养性小分子、代谢物、激素、维生素和细胞因子等可选择性渗透。肾小球基底膜中的硫酸软骨素蛋白聚糖对于原尿的生成即具有筛滤作用。

3. 角膜中蛋白聚糖具有透光性　角膜中主要含硫酸软骨素和硫酸角质素，由于高度硫酸化，使基质脱水变得致密，阻止血管的形成，使角膜柔软并具有透光性，同时角质化具有保护作用。

4. 氨基聚糖有抗凝血作用　肝素蛋白聚糖可与某些凝血因子结合而具有抗凝血作用，肝素蛋白聚糖常以单体形式存在，由靠近血管的肥大细胞分泌产生，并贮存于肥大细胞的颗粒中，当受到刺激时释放入血液，与抗凝血酶相结合，抑制凝血因子的作用，具有抗凝血功能。

5. 细胞表面的蛋白聚糖有传递信息作用　在成纤维细胞和上皮细胞质膜中称为连接素的蛋白聚糖，以其核心蛋白以跨膜糖蛋白的方式嵌入质膜的脂双分子层中，胞外区连有许多硫酸软骨素和硫酸类肝素 GAG 链，可与细胞外基质、生长因子等信号分子结合，胞内区肽段可与膜下肌动蛋白丝相互作用，将细胞外信号传递到细胞内引起细胞内生物学效应。

6. 氨基聚糖和蛋白聚糖与组织老化有关　氨基聚糖和蛋白聚糖的种类和数量随年龄而变动，与发育过程中组织的功能相适应。如在胚胎发育早期，透明质酸生成特别旺盛，它促进细胞增殖、迁移，并起阻止细胞分化作用。透明质酸和硫酸软骨素具有很好的保水性，3 个月胎儿的皮肤中，透明质酸和硫酸软骨素的含量是成人的 20 倍，随着年龄的增长，含量逐渐减少，它们的一部分逐渐被硫酸皮肤素取代。关节软骨中的蛋白聚糖随年龄增长而减少，同时硫酸软骨素逐渐被硫酸角质素取代。随着个体的老化，蛋白聚糖中糖链比重下降，导致组织的保水性及弹性减弱，氨基聚糖和蛋白聚糖变化与老化过程有

关。氨基聚糖的众多阴离子可结合 Ca^{2+}离子，在组织的钙化，尤其是骨盐的沉积中起重要作用。

（四）氨基聚糖和蛋白聚糖与疾病

氨基聚糖和蛋白聚糖的合成与代谢异常与许多疾病有关。蛋白聚糖的降解可在一系列细胞外酶或溶酶体中细胞内酶的催化下进行。由于基因突变引起先天性缺乏降解氨基聚糖的酶（如糖苷酶或硫酸酯酶）可导致氨基聚糖或蛋白聚糖及其降解中间产物在体内一定部位堆积，造成黏多糖累积病（mucopolysaccharidoses），如 Hunter 综合征。

动脉粥样硬化患者血管内皮细胞表面硫酸乙酰肝素和硫酸软骨素含量下降，硫酸皮肤素蛋白聚糖含量升高，使其易与低密度脂蛋白结合，导致脂类沉积。

氨基聚糖的变化和蛋白聚糖分子的异常表达对肿瘤的发生、发展及转移有着重要意义。在一些肿瘤组织中，如间质瘤、乳腺癌、神经胶质瘤细胞合成分泌透明质酸和硫酸软骨素增多，透明质酸形成的含水凝胶有利于细胞的增殖和迁移，并抑制细胞分化；硫酸软骨素可促进乳腺癌、艾氏腹水癌的生长。在人肝癌、小鼠骨髓瘤、自发性乳腺癌中，均有硫酸乙酰肝素硫酸化程度降低现象，为肿瘤细胞的增殖、脱落、侵袭、转移提供了条件。

二、胶原与弹性蛋白

（一）胶原是细胞外基质中的骨架结构

胶原（collagen）是动物体内高度特化的纤维蛋白家族，是人体内含量最丰富的蛋白质，约占人体蛋白质总量的 25%~30%。它遍布于体内各种器官和组织，在结缔组织中特别丰富，是细胞外基质的框架结构。胶原可由成纤维细胞、软骨细胞、成骨细胞以及某些上皮细胞合成并分泌到细胞外。

1. 胶原的分子结构　胶原分子为三股螺旋（triple helix）结构，由 3 条 α 多肽链盘绕而成，长 300nm，直径 1.5nm。每条 α 肽链约含 1 050 个氨基酸残基，其中甘氨酸（Gly）含量占 1/3，同时富含脯氨酸（Pro）和赖氨酸（Lys），脯氨酸和赖氨酸常羟基化成羟脯氨酸（Hypro）和羟赖氨酸（Hylys），赖氨酸选择性糖基化，这些特征为胶原所特有。肽链中的氨基酸组成规律的三肽重复顺序（Gly-X-Y），其中 X 为 Pro，Y 常为 Hypro 或 Hylys。由于三肽重复顺序中甘氨酸的分子量最小，使肽链卷曲成规律的 α-螺旋结构，而肽链的羟化和糖基化使肽链互相交联，形成稳定的 3α-螺旋结构。

2. 胶原的类型　α 链是胶原的基本亚单位，目前已发现 25 种不同的 α 链，每种 α 链由一种基因编码，各种基因产物以不同的方式组合成不同类型的胶原。每型胶原由 3 条相同或不同的 α 链构成，例如Ⅰ型胶原是异源三聚体，由 2 条 α_1（Ⅰ）和 1 条 α_2（Ⅰ）构成；而Ⅱ型和Ⅲ型胶原是同源三聚体，分别由 3 条 α_1（Ⅱ）和 3 条 α_1（Ⅲ）链组成。目前已发现的胶原类型多达 26 种，几种常见的胶原及其特性见表 11-3。

胶原在体内分布有一定的组织特异性。Ⅰ型胶原主要存在于肌腱、皮肤、韧带及骨中，形成较粗的纤维束，具有很强的抗张强度；Ⅱ型胶原主要存在于软骨中；Ⅲ型胶原主要在血管壁和各种软组织或器官间质中形成微细的纤维网；Ⅳ型胶原仅存在基底膜中，形成二维网络样结构。

3. 胶原的合成装配与降解　胶原由结缔组织的成纤维细胞、间充质来源的成骨细胞、成软骨细胞、各种上皮细胞、牙本质细胞和神经组织的雪旺氏细胞等合成和分泌。

胶原分子的基因很大，约 30~40kb。人 α_1（Ⅰ）链的基因含 51 个外显子，多数外显子由 54 个或 54 倍数的核苷酸组成，推测Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型胶原 α 链的基因是由编码 54 个核苷酸的原始基因复制演化而来，但Ⅳ型胶原与它们差别较大。

表 11-3　几种类型的胶原及其特性

类型	亚单位	三股螺旋长度	超分子结构特征	分　布
Ⅰ	$[\alpha_1(\text{Ⅰ})]_2[\alpha_2(\text{Ⅰ})]$	300nm	67nm 横纹纤维	皮肤，肌腱，骨，韧带等
Ⅱ	$[\alpha_1(\text{Ⅱ})]_3$	300nm	67nm 横纹纤维	软骨，髓核，玻璃体等
Ⅲ	$[\alpha_1(\text{Ⅲ})]_3$	300nm	67nm 横纹纤维	皮肤，肌肉，结缔组织，常与Ⅰ型胶原共分布
Ⅳ	$[\alpha_1(\text{Ⅳ})]_2[\alpha_2(\text{Ⅳ})]$	390nm	网状 C 末端球状	基底膜
			不形成纤维束	大多间隙组织
Ⅴ	$[\alpha_1(\text{Ⅴ})]_2[\alpha_2(\text{Ⅴ})]$	390nm	细纤维	与Ⅰ型胶原共分布
	$[\alpha_1(\text{Ⅴ})]_3$		N 末端球状	大多间隙组织
Ⅵ	$[\alpha_1(\text{Ⅵ})][\alpha_2(\text{Ⅵ})]$	150nm	微纤维	与Ⅰ型胶原共分布
	$[\alpha_3(\text{Ⅵ})]$		N 和 C 末端球状 100nm 横纹	

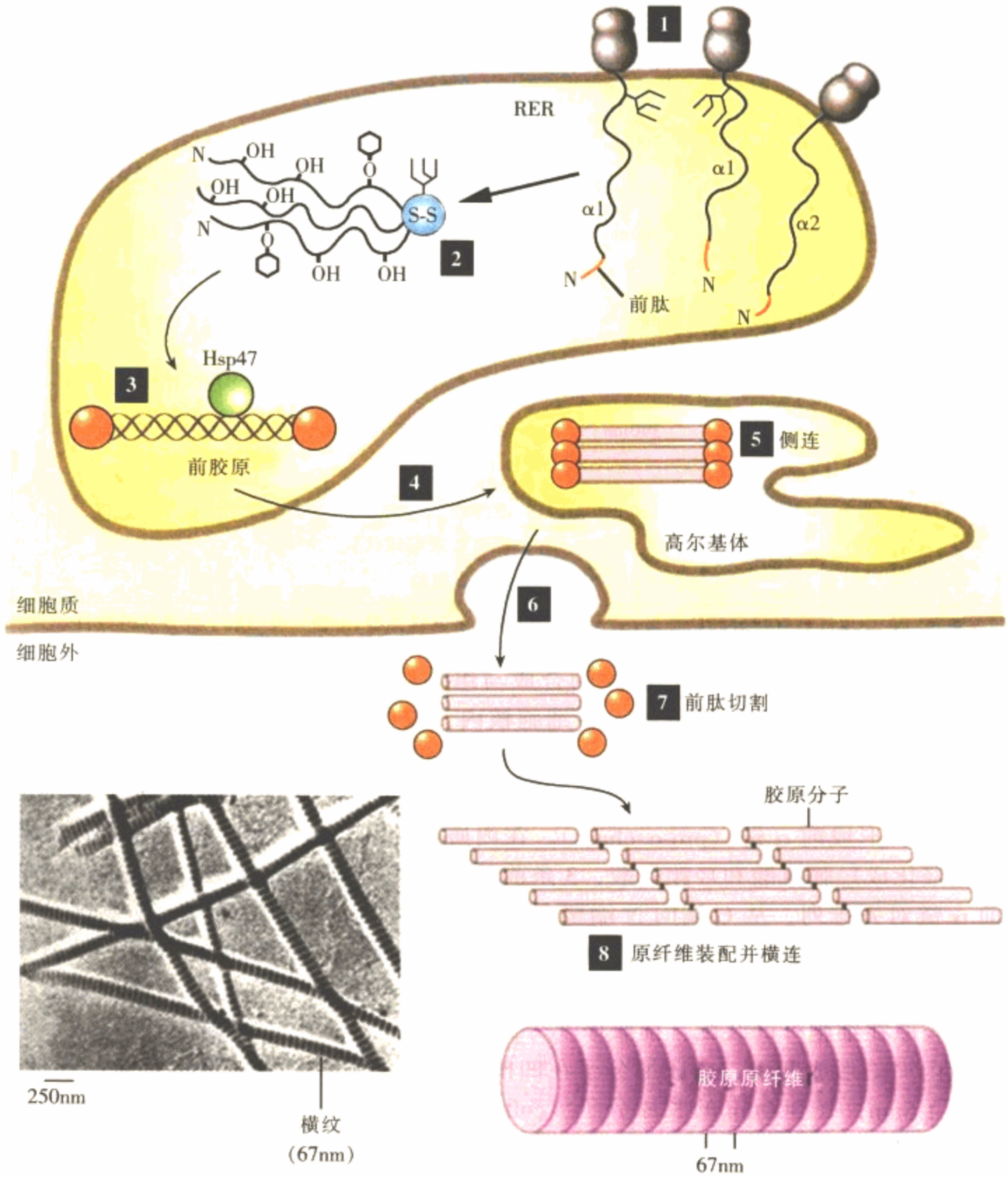
注：亚单位一栏中罗马数字代表胶原类型，α_1，α_2，α_3 分别代表肽链类型，中括号外的数字代表肽链数目。

（1）胶原在细胞内的合成：胶原的合成与组装始于内质网，并在高尔基体中进行修饰，最后在细胞外组装成胶原纤维。在细胞核内，胶原分子 α 链的基因转录成 hnRNA 前体，经过精确的剪接和加工形成 mRNA，mRNA 在粗面内质网膜的核糖体上翻译合成前体肽链，并在内质网腔中切去信号肽，然后在肽链两端各加上一段不含 Gly-X-Y 序列的前肽（prepeptide），形成前 α 链（pro-α-chain）。在内质网腔中，前 α 链中的脯氨酸和赖氨酸残基分别被羟化成羟脯氨酸和羟赖氨酸，3 条前 α 链的 C 端前肽借二硫键形成链间交联，使三条前 α 链对齐排列，从 C 端向 N 端聚合形成带前肽的三股螺旋结构，前肽部分保持非螺旋卷曲。这种带前肽的三股螺旋胶原分子称为前胶原（procollagen）分子。此分子的装配起始于内质网，后经高尔基体加工修饰装配完成，被包进分泌小泡，分泌到细胞外。

（2）胶原在细胞外的装配：前胶原在分泌过程中，由于分泌泡成串排列，与质膜融合后向细胞内深陷形成凹槽，前胶原分子在凹槽中被前肽酶切去在 N 端和 C 端的前肽序列，形成直径 1.5nm，长 300nm 的胶原分子（collagen molecule）。胶原分子在细胞外又进一步按相邻分子相错 1/4 长度（约 67nm），前后分子首尾相隔 35nm 的距离自我装配成明暗相间、直径 10~30nm 的胶原原纤维（collagen fibril）。在细胞外基质中，胶原原纤维常聚集成束，成为直径数微米、光镜下可见的胶原纤维（collagen fiber）（图 11-6）。

Ⅳ型胶原与Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型胶原不同，在 α 链中不含规则的三肽重复顺序（Gly-X-Y），因此不形成 α-螺旋结构；分泌到细胞外基质的前胶原分子的前肽不被切除；在装配成高级结构时，两个前胶原分子的羧基端头对头相接形成二聚体，几个二聚体再相互交联成网络，构成基底膜的骨架结构。Ⅳ型胶原与层粘连蛋白、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖等组装成基底膜。

（3）胶原的降解：一般情况下胶原更新转换率较慢，如骨胶原分子的半衰期可达 10 年。但在创伤修复或炎症反应初期，胶原转换率加快，并伴有胶原类型的转变。胶原分子可被胶原酶（collagenase）降解，胶原酶的活化与抑制对于调节胶原的转换率具有重要作用。创伤组织、癌变组织中胶原酶活性显著增高；一些酶类如蛋白酶、纤溶酶等可以活化胶原酶；结缔组织可以合成胶原酶抑制剂；激素可调节胶原酶的合成和降解，如糖皮质激素可以诱导胶原酶的合成，雌二醇和黄体酮抑制子宫胶原的降解。



●图 11-6　胶原纤维形成过程中在细胞内和细胞外的变化示意图

4. 胶原的功能

（1）胶原在不同组织中行使不同的功能：哺乳动物皮肤中的胶原编织成网，分布于皮下结缔组织中，具有抗衡来自不同方向的拉力的作用。肌腱起着连接肌肉和骨的作用，在肌腱中的胶原纤维沿着肌腱的长轴平行排列，与承受拉力的方向一致，使肌腱具有很强的韧性，能够承受巨大的拉力。在骨、角膜和横膈肌腱中，胶原纤维形成胶合板样多片层结构，角膜形成有序的胶合板样多片层结构使角膜既透明又具有一定强度。Ⅲ型胶原形成微细的纤维网包绕在腺泡、骨骼肌和平滑肌细胞周围。Ⅳ型胶原以三维网络形式构成各种上皮细胞基底膜的网架结构。胶原通过与细胞外基质中各种成分结合，将细胞外基质组织起来，与细胞表面受体结合，连成组织和器官。

（2）胶原与细胞的增殖和分化有关：胶原有刺激上皮细胞增殖的作用，人体内的细胞绝大多数属于贴附依赖性细胞，即只有在一定的细胞外基质上贴附铺展，才能使细胞增殖

周期运行。胶原是细胞贴附的重要基质成分。胶原还起着诱导细胞分化的作用。如干细胞有多向分化潜能，在Ⅳ型胶原和层粘连蛋白上分化为呈片层极性排列的上皮细胞；在Ⅰ型胶原和纤连蛋白上分化为结缔组织的成纤维细胞；在Ⅱ型胶原及软骨粘连蛋白上则分化为软骨细胞。

（3）哺乳动物在发育的不同阶段表达不同类型的胶原：在胎儿皮肤中含有大量的Ⅲ型胶原，随着发育的进程，Ⅲ型胶原逐渐被Ⅰ型胶原取代。正常人皮肤中以Ⅰ型胶原为主。皮肤在损伤后的修复阶段，Ⅲ型胶原含量显著增高。成熟的组织胶原较稳定，半衰期很长，如骨板中胶原分子的半衰期可长达 10 年。在创伤修复或炎症反应初期，胶原表达呈现胚胎期特点，胶原分子间缺乏交联，随着年龄增长，分子交联增多，胶原纤维结构逐渐变得紧密，从而导致皮肤、血管及组织变得僵硬，是衰老的重要特征。

5. 胶原与疾病　胶原与多种疾病或病理过程有关。组织中各种胶原的含量、结构、类型、比例异常均可导致胶原病。如胶原在体内合成与降解平衡发生紊乱，导致组织中胶原不足或过量、基因突变引起胶原分子结构改变，致使胶原装配受阻等。由于胶原的含量、结构、类型或代谢异常而导致的疾病称为胶原病（collagen disease）。

（1）维生素 C 缺乏导致坏血病：在胶原形成过程中，α 链的羟基化和糖基化是肽链间互相交联形成稳定的 3α-螺旋结构的必须条件，该过程需混合功能氧化酶和辅助因子参加（如维生素 C、Fe^{2+}和 α-酮戊二酸）。若辅助因子缺乏，羟化受阻，分子交联失败，将导致组织或血管性疾病。如，维生素 C 缺乏可导致胶原的羟化反应不能充分进行，因此不能形成正常的胶原原纤维，结果非羟化的前 α 链在细胞内被降解。因而，导致血管、肌腱、皮肤变脆，易出血，称为坏血病。

（2）遗传性胶原病：胶原在体内分布广泛，基因突变引起胶原分子的表达或胶原装配异常将导致遗传性胶原病。如，成骨发育不全（osteogenesis imperfecta）综合征，由于基因突变，使Ⅰ型胶原合成障碍，导致骨骼发育不良，畸形，四肢短小，骨质疏松易骨折，重者早年夭折；Ⅱ型胶原基因突变可引起软骨异常，导致骨和关节发育异常；爱-唐综合征（Ehlers-Danlos syndrome）是一组胶原基因突变引起的遗传性疾病，由于胶原 N 端延长或没有切去前肽，使胶原结构细长无规则，造成骨骼和肌腱缺乏刚性，关节活动过度，皮肤、肌腱、血管变脆。

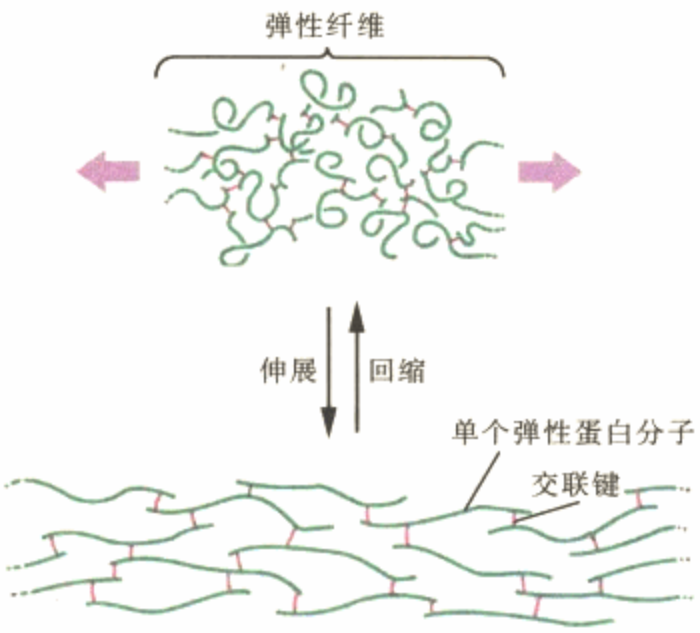
胶原表达过度或分布和比例异常，可造成肝、肺、皮肤病理性纤维化。如在正常的肝脏中，胶原蛋白约占总蛋白的 5%~10%，在发生肝硬化时，胶原蛋白可占肝脏总蛋白的 50%甚至更多。

（3）免疫性胶原病：胶原可引起免疫性疾病。天然或变性的胶原分子，均可引起免疫反应。正常情况下，人体对自身胶原结构组织具有免疫耐受性，如果机体丧失对自身胶原结构的免疫耐受，即可产生自身免疫性胶原组织损伤，导致类风湿性关节炎及慢性肾炎等。免疫复合物在胶原组织中沉积，可引起炎症反应。

（二）弹性蛋白是构成细胞外基质中弹性纤维网络的主要成分

弹性蛋白（elastin）是构成细胞外基质中弹性纤维网络的主要成分。人体一些器官组织在执行生理功能过程中，既需要强度也需要弹性，在受到外力牵拉后可迅速恢复原状，如皮肤、大动脉血管和肺等。由弹性蛋白形成的弹性纤维网络就赋予组织这种特性。

弹性蛋白是高度疏水的非糖基化纤维蛋白，是构成组织中弹性纤维网络的主要成分。其肽链含约 830 个氨基酸残基，像胶原一样富含甘氨酸和脯氨酸，但很少羟化，不含羟赖氨酸，无糖基化修饰。由于肽链中不含胶原特有的三肽（Gly-X-Y）重复序列，故不形成规则的三股螺旋，而呈无规则的卷曲。弹性蛋白的肽链由两种类型短肽交替排列构成，一种是疏水性短肽，赋予分子以弹性；另一种短肽为富含丙氨酸和赖氨酸残基的 α-螺旋，



●图 11-7　弹性蛋白网络的伸展和回缩

负责在相邻分子间形成交联。每种短肽各由一个外显子编码。

弹性蛋白以可溶性弹性蛋白原（tropoelastin）的形式分泌到细胞外，通过赖氨酸残基之间相互交联装配成弹性纤维网。由于弹性蛋白的无规则卷曲及高度交联，使弹性纤维网可以像橡皮条一样的伸长与回缩(图 11-7)，其伸展能力比同样截面的橡皮条至少高 5 倍。胶原纤维与弹性纤维相互交织，可以限制其伸展程度，防止组织撕裂。弹性蛋白的降解主要由弹性蛋白酶（elastase）催化。

弹性纤维（elastic fiber）并非单纯由弹性蛋白构成，在弹性蛋白的表面还包绕着一层由糖蛋白构成的微原纤维（microfibrils），其中一种较大的糖蛋白 fibrillin 是保持弹性纤维完整性必需的成分，它的基因发生突变可导致一种称为马方综合征（Marfan's syndrome）的遗传性疾病，影响富含弹性纤维的结缔组织，严重者有主动脉破裂倾向。

弹性蛋白是动脉中含量最高的细胞外基质蛋白质，可占主动脉干重的 50%。弹性蛋白基因的突变可导致动脉壁平滑肌细胞过度增殖而引起动脉狭窄。弹性蛋白与无弹性的胶原互相交织，可维持皮肤的韧性，并可防止组织和皮肤过度伸展和撕裂。在老年组织中，弹性蛋白生成减少，降解增强，使组织失去弹性。

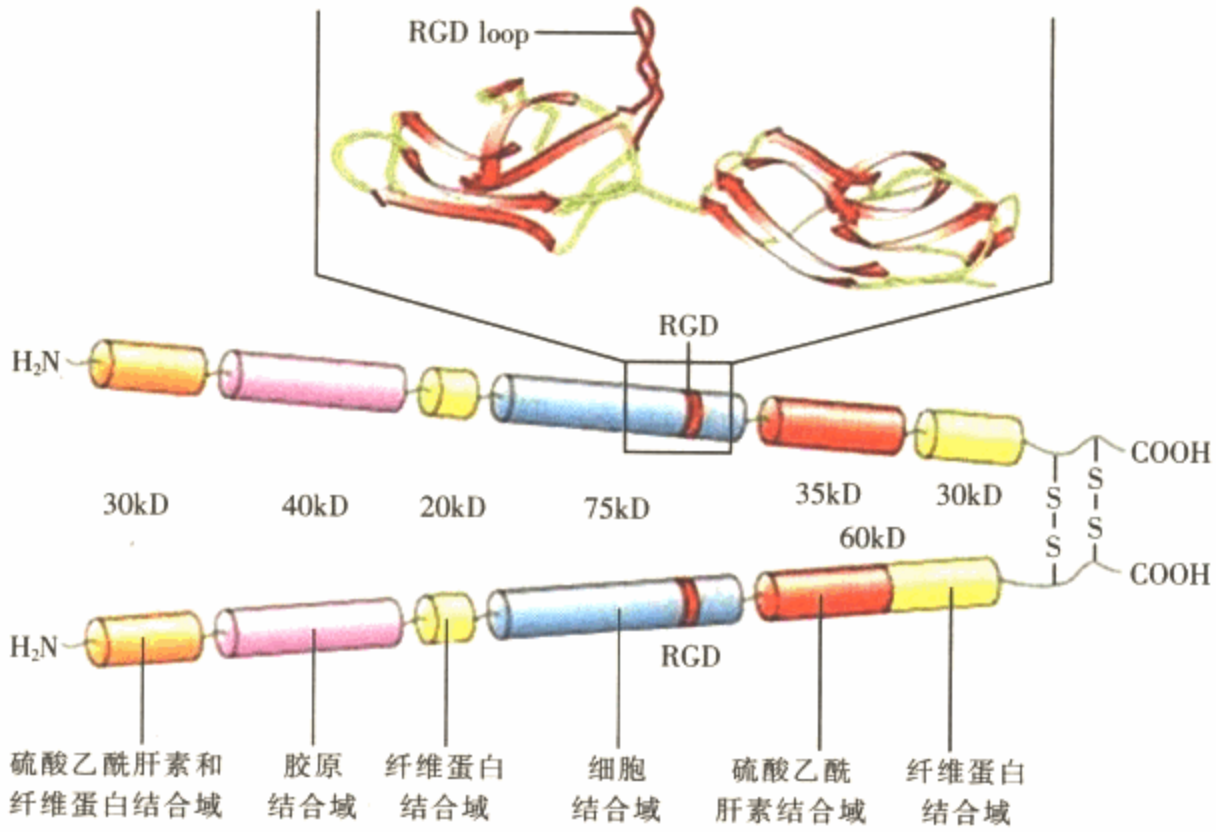
三、细胞外基质中的非胶原性黏合蛋白

在细胞外基质中除了纤维性胶原蛋白外，还含有许多非胶原性黏合蛋白（noncollagen adhesive protein）。黏合蛋白分子由多个区域组成，每个区域都含有可同其他基质大分子或细胞表面受体专一结合的位点。因此，这类蛋白质分子的共同特点是既可与细胞结合，又可与细胞外基质中其他大分子结合，从而使细胞与细胞外基质相互黏着，故称为细胞外基质中的黏合蛋白。目前已经在细胞外基质中发现了数十种黏着糖蛋白，它们在结构上往往具有多个结构域，可与多种细胞及细胞外基质成分结合，是细胞外基质的组织者，对细胞的存活、形态、黏着、铺展、迁移、增殖、分化有直接影响。纤连蛋白和层粘连蛋白是当前研究得最清楚的两种非胶原性黏合蛋白。

（一）纤连蛋白广泛存在于动物组织中

纤连蛋白（fibronectin，FN）是细胞外基质中发现最早的黏合蛋白，广泛存在于人和动物组织中，属于高分子量糖蛋白，其糖含量因组织不同和分化状态不同而有差异，大约为 4.5%~9.5%。纤连蛋白有两种存在形式：一种是可溶性的纤连蛋白，主要存在于血浆(0.3mg/ml）及各种体液中，由肝实质细胞分泌产生，称为血浆纤连蛋白；另一种是不溶性的纤连蛋白，主要存在于细胞外基质（包括某些基底膜）及细胞表面，主要由间质细胞分泌产生，称为细胞纤连蛋白。

1. 纤连蛋白的分子结构　各种纤连蛋白均由相似的亚单位（分子量为 220~250kD）组成。血浆纤连蛋白是由两条相似的肽链形成的二聚体（dimer）(450kD)，两条肽链在 C 末端形成二硫键交联，呈 V 字形；细胞纤连蛋白为由二聚体交联后形成的多聚体。不同组织来源的纤连蛋白亚单位在结构上稍有区别，每条肽链约含 2 450 个左右氨基酸残基，构成 5~7 个有特定功能的球形结构域，各结构域之间的肽段连接部位可折曲，对蛋白酶敏感(图 11-8)。因此可以通过胰蛋白酶的水解作用分离这些结构域来研究它们的功能。研究证



●图 11-8　纤连蛋白二聚体的分子结构

实，不同的球形结构域上含有不同的大分子结合位点，可分别与不同的生物大分子或细胞表面受体结合，是一种多功能分子。可以与纤连蛋白结合的物质很多，如胶原、肝素、纤维蛋白、血小板反应蛋白、凝血因子、多胺以及 DNA 等。

研究表明，纤连蛋白肽链中的某些特殊的短肽序列，如 Arg-Gly-Asp（RGD）三肽是细胞表面各种纤连蛋白受体识别并结合的最小结构单位。如果该结构区发生突变或缺失，则会导致纤连蛋白与细胞的黏附活性显著下降。一些含有 RGD 序列的短肽，可与纤连蛋白竞争结合细胞膜上的纤连蛋白受体，因此，这种短肽序列具有抑制细胞同纤连蛋白结合的作用。但 RGD 序列并不是纤连蛋白所独有的，许多细胞外基质蛋白都含有这种序列。此序列可被细胞表面受体中的整联蛋白所识别。因此，所谓的 RGD 序列，即是指纤连蛋白和其他某些细胞外基质中所含有的可被细胞表面某些整联蛋白所识别的 Arg-Gly-Asp 三肽序列。

纤连蛋白的膜受体是膜整联蛋白家族成员之一，是一种高分子量的跨膜糖蛋白，由 α、β 两条多肽链通过非共价键结合而成，在其细胞外功能区有与 RGD 序列高亲和性结合部位（见第十章第二节，图 10-16）。

目前在人体中已鉴定的纤连蛋白亚基就有 20 种以上，它们是由同一基因编码的产物，转录后由于拼接上的不同而形成多种异型分子。编码人纤连蛋白的基因包含 50 个以上的外显子和内含子，通过转录后选择性剪接和翻译后修饰形成了多种异型分子，具有不同的生物学功能。

2. 纤连蛋白的功能　纤连蛋白与细胞的形状、黏着、迁移、增殖、分化以及创伤修复、肿瘤转移等均有密切关系。

（1）介导细胞与细胞外基质间的黏着：纤连蛋白分子的多结构域以及其排列的特点，使得它可以同时与细胞外基质中多种生物大分子结合并介导细胞与细胞外基质、细胞之间的相互黏着。通过黏着斑的作用，调节细胞的形状和细胞骨架的装配，促进细胞的铺展，加速细胞的增殖与分化。

（2）纤连蛋白与细胞的迁移：细胞的迁移依赖于细胞的黏附与去黏附以及细胞骨架的组装与去组装。在黏着斑处纤连蛋白受体通过纤连蛋白介导细胞与胞外基质黏附。细胞通

过黏着斑的形成与解离，影响细胞骨架的组装与去组装，促进细胞的迁移运动。

在胚胎发育早期，细胞分泌大量的纤连蛋白促进细胞迁移，例如在神经管形成时，神经嵴细胞从神经管的背侧迁移到胚胎特定区域，分化成神经节、色素细胞等不同类型的细胞。如果注射纤连蛋白受体的抗体或含 RGD 序列的短肽，就阻断了细胞的迁移。

（3）纤连蛋白在组织创伤修复中的作用：血浆中的纤连蛋白能促进血液凝固和创伤面的修复。在组织创伤修复过程中，血浆纤连蛋白可与血浆纤维蛋白结合，在伤口处吸引成纤维细胞、平滑肌细胞和内皮细胞向伤口迁移，形成肉芽组织，然后形成瘢痕，同时还可以刺激上皮细胞增生，使创面修复。

3. 纤连蛋白与疾病　血浆纤连蛋白在促进血液凝固和创伤修复中起重要作用，由于血浆纤连蛋白主要来自肝实质细胞，少量来自血管内皮细胞，当肝坏死、严重肝炎、肝硬化、弥漫性肝癌时，血浆纤连蛋白显著降低。

纤连蛋白与肾小球肾炎发生有关。在肾小球基底膜中含有大量纤连蛋白，DNA、金黄色葡萄球菌、链球菌、胶原、纤维蛋白的降解产物可以直接或以免疫复合物的形式与纤连蛋白结合而沉积在肾小球基底膜上，引起肾小球肾炎。血浆中纤连蛋白可与上述降解产物和免疫复合物结合，被肝 Kupffer 细胞和脾巨噬细胞表面受体识别而被清除，对肾脏起保护作用。

在创伤愈合过程中，组织局部的纤连蛋白过度表达，可导致瘢痕过度形成。

由于恶性肿瘤细胞表面的纤连蛋白受体异常，细胞黏着能力下降，使细胞容易分散和转移。

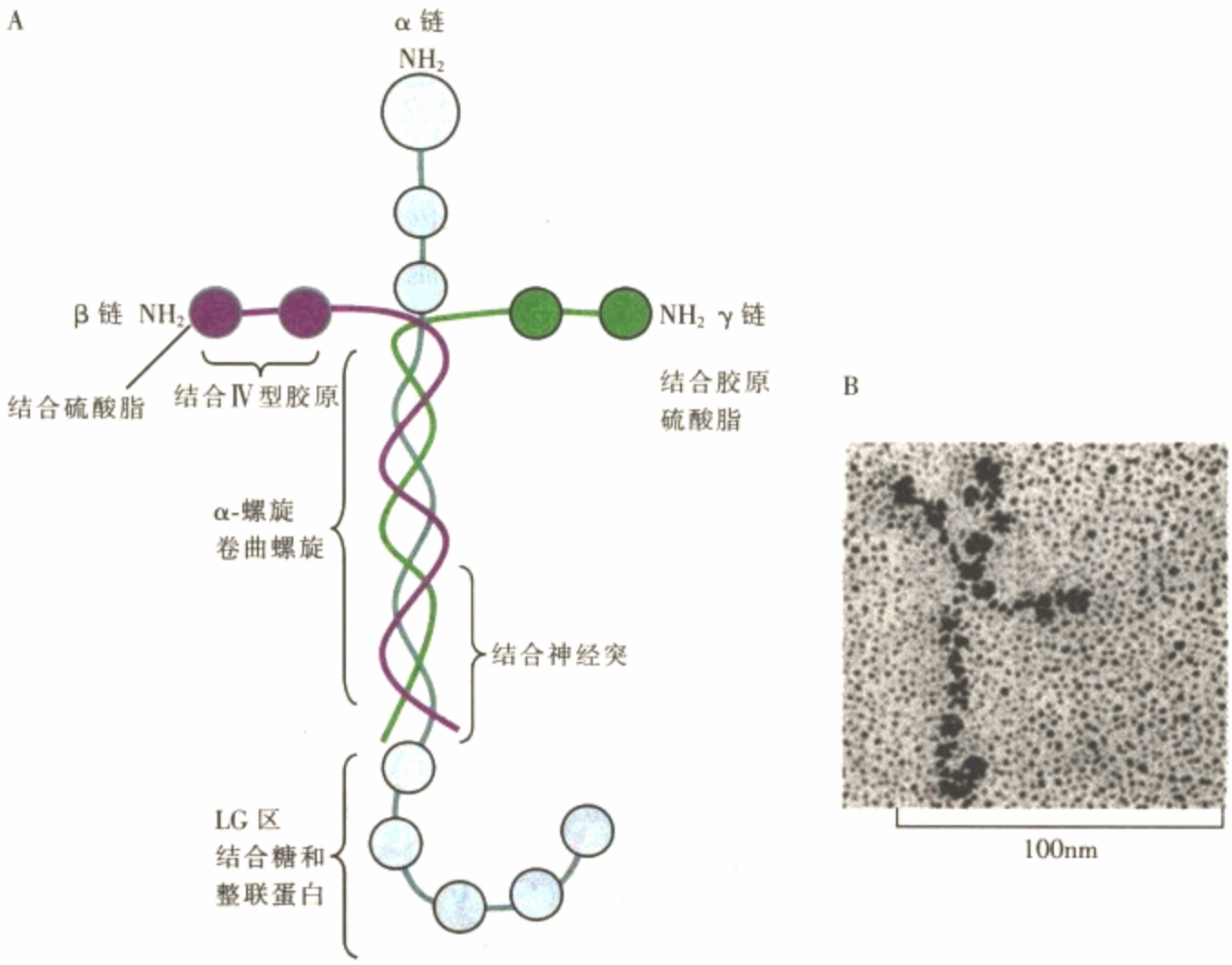
（二）层粘连蛋白是胚胎发育过程中出现最早的细胞外基质成分

层粘连蛋白（laminin，LN）是胚胎发育过程中出现最早的细胞外基质成分，同时也是基底膜的主要结构组分之一。层粘连蛋白是黏合糖蛋白，含糖 13%~28%。在成体，它存在于上皮下和内皮下紧靠细胞基底部，还存在于肌细胞和脂肪细胞周围。在不同种属及组织中先后发现了多种层粘连蛋白异型分子，它们结构复杂，功能多样，除了构成基底膜的片层网状结构外，还与细胞的分化、黏附、迁移和增殖有关。

1. 层粘连蛋白的分子结构　层粘连蛋白是一种高分子量糖蛋白，分子量为 820~850kD，70nm 长。层粘连蛋白是由 α、β、γ 三条不同的多肽链组成的异三聚体。三聚体分子由一条重链（α 链）和二条轻链（β、γ 链）借二硫键交联而成，外形呈不对称十字形结构，有三条短臂和一条长臂。三条短臂各由三条肽链的 N 端序列构成。在 β 和 γ 短臂上有两个球形结构域和一个短杆区；α 链形成的短臂有 2~3 个球形结构域及 2 个短杆区；长臂由 3 条肽链的近 C 端肽段共同形成长臂的杆区，长臂末端的大球区仅由 α 链 C 端肽段卷曲而成（图 11-9）。层粘连蛋白分子中存在的多个结构域，具有和多种物质结合的位点，如与Ⅳ型胶原、硫酸乙酰肝素、肝素、脑苷脂和神经节苷脂等以及细胞表面受体（整联蛋白）结合的位点。

现已证明层粘连蛋白分子中至少有 8 个与细胞结合的位点，可以分别与上皮细胞、内皮细胞、某些成纤维细胞、神经元、神经鞘细胞以及肿瘤细胞等结合。在层粘连蛋白分子上还发现了能与化脓性链球菌等原核细胞结合的部位。层粘连蛋白主要由附着在基底膜上的上皮细胞和内皮细胞以及被基底膜包绕的肌细胞等分泌产生。

层粘连蛋白是一个大的蛋白质家族，现已鉴定出 8 种不同一级结构序列的层粘连蛋白亚单位（α_1，α_2，α_3，β_1，β_2，β_3，γ_1 和 γ_2），它们构成了 7 种不同的层粘连蛋白。与纤连蛋白不同的是，这 8 种亚单位分别由 8 个结构基因编码，在不同的组织类型和不同的发育阶段，由不同分子结构的层粘连蛋白表达。



●图 11-9　层粘连蛋白的分子结构

A. 层粘连蛋白的分子结构模式图　B. 电镜照片

2. 层粘连蛋白的功能　层粘连蛋白是基底膜的主要组分，在基底膜的基本框架的构建和组装中起了关键作用（见本章第二节）。

层粘连蛋白分子上也有被上皮细胞、内皮细胞、神经细胞、肌细胞以及多种肿瘤细胞表面层粘连蛋白受体识别与结合的 RGD 三肽序列，使细胞黏附固定在基底膜上，促进细胞的生长并使细胞铺展而保持一定的形态。层粘连蛋白通过与细胞间的相互作用，可直接或间接控制细胞的活动，如细胞的黏附、迁移、分化、增殖或凋亡以及基因表达。

层粘连蛋白在早期胚胎中对于保持细胞间的黏附、细胞的极性及细胞的分化具有重要意义。层粘连蛋白还有助于神经元在体外存活，并可在缺乏神经生长因子的情况下，促进中枢及外周神经元轴突的生长。

3. 层粘连蛋白与疾病　层粘连蛋白在体内的合成与降解异常与许多疾病有关，如糖尿病具有广泛的基底膜改变，糖尿病性肾病的肾小球基底膜中层粘连蛋白的含量明显降低，血清和尿中出现层粘连蛋白和Ⅳ型胶原的降解产物。

一些疾病与层粘连蛋白的自身免疫反应有关，如由链球菌感染所致的肾小球肾炎患者血中出现抗层粘连蛋白的抗体，从而引起自身免疫反应，使肾小球基底膜受损；在扩张性心肌病与心肌炎患者血清中也检测到抗层粘连蛋白的抗体。层粘连蛋白具有促进肿瘤细胞生长和转移的作用。

第二节　细胞外基质的特化结构——基底膜

基底膜（basal lamina 或 basement membrane）是细胞外基质的特化结构形式，存在于

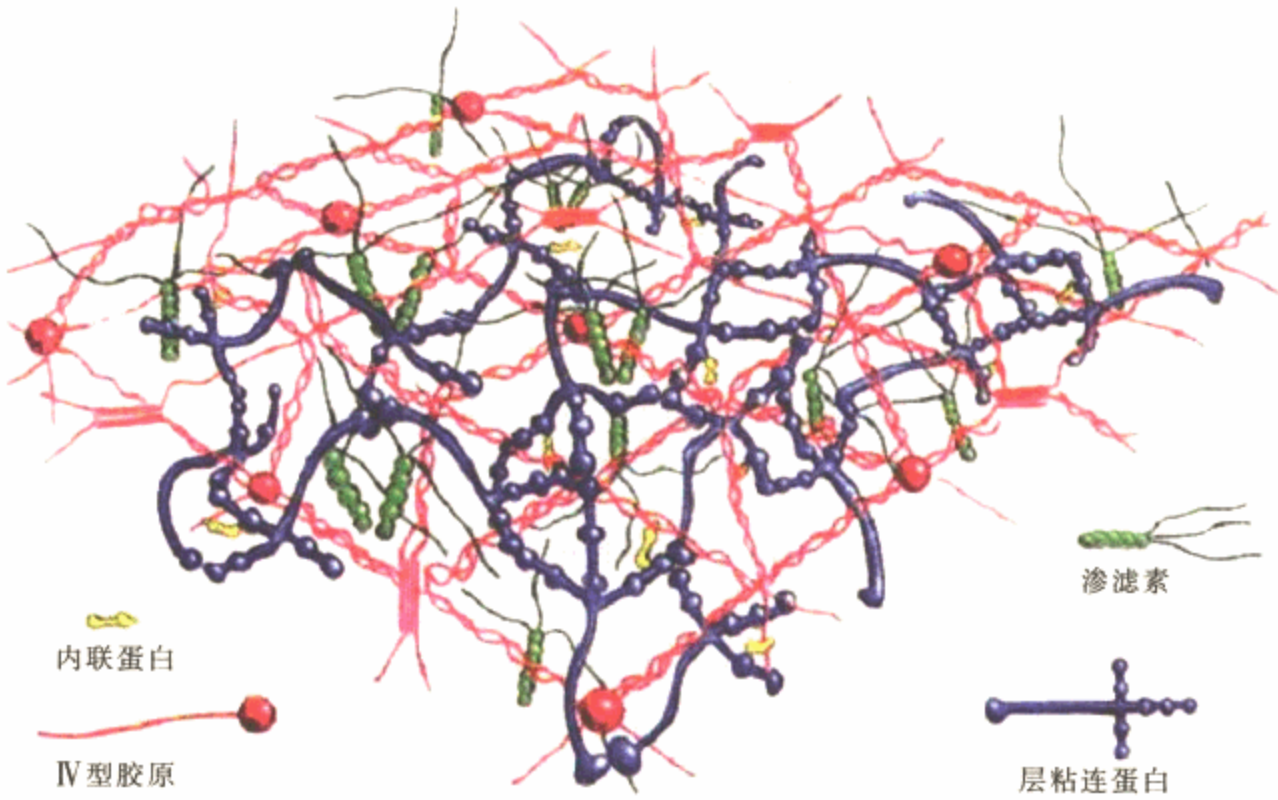
多种组织之中。

一、基底膜的分布

基底膜是细胞外基质特化而成的一种柔软、坚韧的网膜结构，一般厚 40~120nm。基底膜位于上皮细胞和内皮细胞的基底部，或包绕在肌细胞、脂肪细胞、雪旺氏细胞周围，将细胞与结缔组织隔离。

二、基底膜的组成成分

构成基底膜的绝大多数细胞外基质组分都是由位于基底膜上的细胞所分泌产生的。基底膜主要由以下 4 种成分组成（图 11-10）。



●图 11-10　基底膜的分子结构模型

1. Ⅳ型胶原　Ⅳ型胶原是构成基底膜的主要结构成分之一。400nm 长的三股螺旋结构的Ⅳ型胶原分子，被非螺旋片段隔断 24 次，非螺旋区为Ⅳ型胶原分子提供了柔韧性。各Ⅳ型胶原分子通过 C 端球状头部之间的非共价键相互作用，以及 N 端非球状尾部之间的共价交联，形成了构成基底膜基本框架的二维网络结构。

2. 层粘连蛋白　基底膜中的层粘连蛋白呈现出特有的非对称型十字结构，它们之间通过长臂和短臂的臂端相连，装配成二维纤维网络结构，并进而通过内联蛋白（entactin）与Ⅳ型胶原二维网络相连接。

3. 内联蛋白　内联蛋白分子呈哑铃状，它不仅作为连接Ⅳ型胶原纤维网络与层粘连蛋白纤维网络之间的桥梁，而且还可以协助细胞外基质中其他成分的结合，在基底膜的组装中起着重要的作用。

4. 渗滤素　渗滤素（perlecan）是基底膜中最丰富的蛋白聚糖之一，它包含一个巨大的多结构域的核心蛋白质（分子量约 400kD），其糖链主要为硫酸乙酰肝素，该糖链连接于核心蛋白质的 N 端，可与胶原、层粘连蛋白等结合，共同构成基底膜的网络结构。肾小球基底膜中的渗滤素对于原尿的生成具有筛滤作用。

三、基底膜的生物学功能

基底膜不仅是一层结构膜，而且具有多方面的功能。基底膜是上皮细胞的支撑垫，在上皮组织与结缔组织之间起结构连接作用，同时，还具有其他方面的作用。比如，基底膜作为细胞的选择性通过屏障，通常可以阻止结缔组织细胞与基底膜上的上皮细胞接触，但却允许淋巴细胞、巨噬细胞和神经元突触穿越通过；基底膜对分子的通透具有高度选择性，如肾小球基底膜在原尿形成过程中可以阻挡血液中细胞及蛋白质的透过，起选择性筛滤作用。此外，细胞的形态、细胞的极性、细胞代谢、质膜上蛋白质的分布、细胞存活、细胞增殖分化、细胞迁移等许多生命活动现象，均与基底膜有着非常密切的关系。

第三节　细胞外基质与细胞间的相互作用

机体的组织是由细胞与细胞外基质共同构成的，两者之间有着十分密切的关系。一方面细胞通过控制基质成分的合成和降解决定细胞外基质的组成，另一方面细胞外基质对细胞的各种生命活动有着重要的影响。两者相互依存，相互影响，共同决定着组织的结构与功能。

一、细胞外基质对细胞生物学行为的影响

（一）细胞外基质影响细胞的形态结构

体外实验表明，当一种细胞在不同的细胞外基质上黏附和铺展时，可呈现不同的形状。细胞黏附在基底膜上生长时，基质成分与细胞表面整联蛋白结合，影响细胞骨架成分呈不同方式的组装和排列，从而赋予细胞不同的形状。上皮细胞只有黏附在基底膜上才能显示其极性，并通过细胞连接成为柱状上皮。如果细胞脱离了细胞外基质就会成为游离的球形。

细胞外基质除了与细胞一起构建组织，具有支持、连接细胞和保护作用外，还对细胞的结构与功能有着重要的影响。只有在细胞外基质存在的条件下，组织中的细胞才能维持正常形态和行使各种生物学功能。

（二）细胞外基质影响细胞的生存与死亡

人体内大多数类型的细胞需要黏附在一定的细胞外基质上才能存活，细胞外基质对细胞的生存与死亡起着非常重要的作用。例如，上皮细胞和内皮细胞一旦脱离了细胞外基质就会发生凋亡。细胞脱离细胞外基质就会走向凋亡的现象称为失巢凋亡（anoikis）。这主要是由于细胞脱离细胞外基质后，细胞骨架松散而致线粒体释放细胞色素 C，从而活化 caspase 凋亡途径而导致细胞凋亡。当细胞黏附在细胞外基质上与整联蛋白结合后可介导细胞的信号转导途径，刺激细胞的增殖而存活。

（三）细胞外基质影响细胞的增殖和分化

体外培养细胞实验证实，大多数细胞只有黏附和铺展在细胞外基质上才能增殖，一旦脱离了细胞外基质成为游离的球形时细胞就不能增殖，这种现象称为锚定依赖性生长（anchorage dependent growth）。细胞的这种特性是由于细胞锚定在基质上时，可以接受生长因子的刺激，通过整联蛋白将信号传递到细胞内，促使细胞从 G_1 期进入 S 期。现在发现，细胞外基质成分的分子结构中存在某些生长因子的同源序列，可对细胞的增殖产生促

进作用。肿瘤细胞可以在悬浮状态下增殖，丧失了锚定依赖性。

细胞外基质还与细胞的分化有着密切的关系。实验表明，特定的细胞外基质可使某些类型的细胞撤离细胞周期而进入细胞分化状态，如内皮细胞在胶原基质上培养时进行增殖，而在层粘连蛋白基质上则停止增殖进行分化，形成毛细血管样结构。如果在上述内皮细胞培养系统中加入抗层粘连蛋白抗体，可以防止内皮细胞分化。

（四）细胞外基质影响细胞的迁移

无论在个体发育过程还是在成体组织再生以及创伤修复过程中都伴随着十分活跃的细胞迁移运动。在细胞迁移过程中，细胞发生黏附与去黏附、细胞骨架组装与去组装等，都离不开细胞外基质的影响。细胞通过基底膜迁移时，需要基质成分的局部降解，胶原酶等基质金属蛋白酶在这一过程中通过分解局部的基质成分，开辟道路促进细胞的迁移。蛋白酶抑制剂可阻止细胞的迁移。这种情况可发生在白细胞穿过血管基底膜迁移至炎症或创伤部位，也可发生在肿瘤细胞浸润和转移过程。

二、细胞对细胞外基质的影响

（一）细胞外基质由其所在组织细胞分泌

各种组织的细胞外基质的成分、含量和存在形式不同，都是由该组织的细胞（包括实质细胞和间质细胞）合成和分泌的。同一个体的不同组织，在不同的发育阶段，所产生的细胞外基质也有所不同。例如，胚胎结缔组织的细胞外基质主要产生Ⅲ型胶原、透明质酸和弹性蛋白；而成年结缔组织中成纤维细胞产生的细胞外基质以Ⅰ型胶原、纤连蛋白等为主要成分。细胞外基质的成分随组织的类型和功能状态的不同也有差异，如软骨组织中由成软骨细胞分泌的细胞外基质主要有Ⅱ型胶原和蛋白聚糖等。

（二）细胞外基质成分的降解是在细胞的控制下进行的

细胞外基质成分的降解也是由细胞分泌的蛋白水解酶催化的。细胞外基质成分在细胞分泌的基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases，MMPs）和丝氨酸蛋白酶家族联合作用下被降解。细胞还可分泌基质金属蛋白酶和丝氨酸蛋白酶的抑制剂控制蛋白酶的作用程度和范围。细胞对细胞外基质成分降解的控制和调节对创伤修复、组织重构以及细胞的迁移都有重要作用。

小结

细胞外基质是由细胞分泌到细胞外空间，由分泌蛋白和多糖构成的精密有序的网络结构。构成细胞外基质的大分子种类大致可分为三类：氨基聚糖与蛋白聚糖、胶原和弹性蛋白以及非胶原性黏合蛋白：纤连蛋白和层粘连蛋白。细胞外基质不仅对组织细胞起支持、保护、营养作用，而且还与细胞的增殖、分化、代谢、识别、黏着、迁移等基本生命活动密切相关。

氨基聚糖是由重复二糖单位构成的直链多糖，可与核心蛋白共价结合形成高分子复合物——蛋白聚糖，其分子表面带有大量的负电荷，可结合大量水分子，构成了细胞外高度水合的凝胶状基质，赋予组织良好的弹性和抗压性。

胶原是动物体内高度特化的纤维蛋白家族，胶原分子是由3条α多肽链盘绕成的三股螺旋结构，其合成与组装始于内质网，并在高尔基体中进行修饰，最后在细胞外组装成胶原纤维。胶原使肌腱具有很强的韧性，Ⅳ型胶原装配成的片层网架形成了基底膜的主要结构。弹性蛋白在基质中形成了交联网络，增强了基质的弹性和韧性。

纤连蛋白广泛分布于结缔组织中，而层粘连蛋白主要存在于基底膜中，它们是细胞外基质中的黏合蛋白，其分子肽链中包含多个功能结合区，可同基质中其他大分子或细胞表面受体结合，从而使细胞与细胞外基质相互黏着。整联蛋白是细胞表面的细胞外基质受体，纤连蛋白和某些细胞外基质蛋白肽链中的RGD序列可被整联蛋白识别，并与之结合，起连接和信号传递作用。纤连蛋白和层粘连蛋白是细胞外基质的组织者，对细胞的存活、形态、黏着、铺展、迁移、增殖、分化有直接影响。细胞外基质对细胞的形态和生命活动具有全方位的调控作用。

（辛　华）

第十二章　细胞的信号转导

多细胞生物个体的细胞每时每刻都在接受和处理来自胞内以及胞外的各种信号，这些细胞信号的传递和整合在生命中具有重要作用，它不仅影响细胞本身的活动，而且还能使单个细胞在代谢、运动、增殖和分化等行为上与细胞群体以及机体的整体活动保持协调一致。可以说，细胞的一切生命活动都与信号有关。细胞之间联系的信号有许多种，由细胞分泌的、能够调节机体功能的生物活性物质是一类重要的化学信号分子，它们通过与细胞膜上或胞内的受体特异性结合，将信号转换后传给相应的胞内系统，使细胞对外界信号做出适当的反应，这一过程称为信号转导(signal transduction)。近年来，通过对胞外第一信使、受体、胞内第二信使及蛋白激酶等信号转导要素的研究，使有关信号转导机制的认识逐渐深入到分子水平。目前已经证实，细胞内存在多种信号转导方式及途径，而且彼此间可交叉调控，构成复杂的信号网络（signaling network）。阐明信号转导的机制不仅能加深对细胞生命活动本质的认识，也有助于人们对肿瘤发生、药物和毒物的作用等机制的研究。

第一节　细胞外信号

细胞所接受的信号包括物理信号、化学信号等，其中最重要的是由细胞分泌的、能够调节机体功能的一大类生物活性物质，它们是细胞间通讯的信号，被称为“第一信使”。这类信号分子主要是蛋白质、肽类、氨基酸及其衍生物，也包括类固醇激素和一氧化氮等。第一信使分子的一级结构或空间构象中携带着某些信息，当它们与位于细胞膜上或细胞浆内特定的受体结合后，后者可将接收到的信息转导给细胞浆或细胞核中的功能反应体系，从而启动细胞产生效应。化学信号分子大部分是水溶性的，不能通过细胞膜，少数是脂溶性的，可以直接穿越胞膜到达细胞内。根据胞外信号的特点及作用方式，化学信号分子可分激素、神经递质和局部化学介质三种类型。激素由内分泌细胞合成，经血液或淋巴循环到达机体各部位的靶细胞。这类信号分子的作用特点是距离远、范围大、持续时间较长。胰岛素、甲状腺素和肾上腺素是它们的代表。神经递质由神经元的突触前膜终端释放，作用于突触后膜上的特殊受体。这类信号分子如乙酰胆碱、去甲肾上腺素等，具有作用时间和作用距离短等特点。局部化学介质是由某些细胞产生并分泌的一大类生物活性物质，包括生长因子、前列腺素和一氧化氮（NO）等。它们不进入血液，而是通过细胞外液的介导，作用于附近的靶细胞（同种细胞或异种细胞）。一些细胞外信息物质影响细胞内代谢的可能途径见表 12-1。

根据与受体结合后细胞所产生的效应的不同，也可将胞外信号分子分为激动剂和拮抗剂两大类。激动剂是指与受体结合后能使细胞产生效应的物质。与受体结合的部位与内源性配体相同，产生的细胞效应与内源性配体相当或更强者称为Ⅰ型激动剂；与受体结合的部位不同于内源性配体，本身不能使细胞产生效应，但可增强内源性配体对细胞的作用者为Ⅱ型激动剂。拮抗剂是指与受体结合后不产生细胞效应，但可阻碍激动剂对细胞作用的物质。Ⅰ型拮抗剂结合于受体的部位与内源性配体相同，可阻断或减弱内源性配体对细胞的效应；而Ⅱ型拮抗剂结合于受体的部位与内源性配体不同，能阻断或减弱内源性配体对细胞的作用。

表 12-1　细胞外信息物质影响细胞功能的途径

信息物质	受体	引起细胞内的变化
神经递质		
乙酰胆碱、谷氨酸、氨基丁酸	膜受体	引起离子通道开闭
生长因子		
类胰岛素生长因子-1、表皮生长因子、血小板衍生生长因子	膜受体	引起酶蛋白和功能蛋白的磷酸化和脱磷酸化，改变细胞的代谢和基因表达
激素		
蛋白质、多肽及氨基酸衍生类激素	膜受体	同上
类固醇激素、甲状腺素	膜内受体	调节转录
维生素		
维生素 A、维生素 D	膜内受体	调节转录

第二节　受　　体

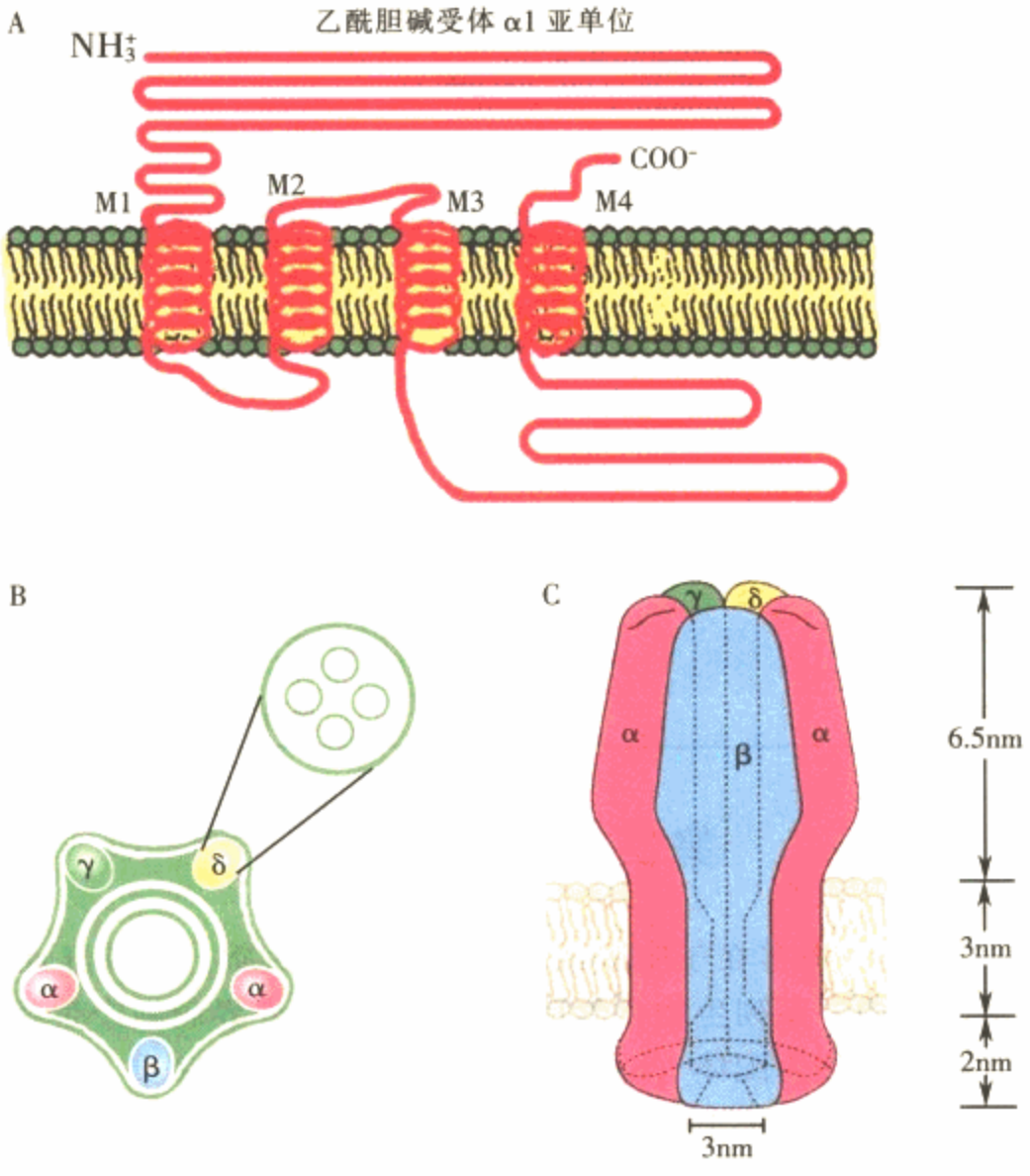
受体（receptor）是一类存在于胞膜或胞内的特殊蛋白质，能特异性识别并结合胞外信号分子，进而激活胞内一系列生物化学反应，使细胞对外界刺激产生相应的效应。与受体结合的生物活性物质统称为配体（ligand），包括激素、神经递质、生长因子、某些药物和毒物等。受体在信号转导系统中的作用非常关键，它通过识别和结合配体，触发整个信号转导过程。

一、受体种类

膜受体主要为镶嵌在胞膜上的糖蛋白，由与配体相互作用的细胞外域、将受体固定在细胞膜上的跨膜域和起传递信号作用的胞内域三部分构成，其配体是一些亲水的、不能直接穿越细胞膜脂质双分子层的肽类激素、生长因子和递质等。胞内受体为 DNA 结合蛋白，可与来自胞外的亲脂性小分子甾类激素等结合，作为转录因子与 DNA 顺式作用元件结合，调节基因的表达。

（一）膜受体包括离子通道型受体、G 蛋白耦联受体和具备酶活性的受体三种类型

1. 离子通道型受体　离子通道型受体（ion channel receptor）通常是由多个亚基组成的多聚体，每个亚基具有 2、4 或 5 个跨膜域，亚基在胞膜上组装成环状的、中间可通过离子的孔道。根据受体的氨基酸组成及跨膜区的特点，可将离子通道型受体分为三类受体超家族。Ⅰ型受体超家族：以烟碱型乙酰胆碱受体（nicotinic acetylcholine receptor，nAchR）为代表，常存在于神经元和神经肌肉接头处，有 α_2、β、γ、δ 五个亚基，每一亚基的分子量为 40~58kD，各含 4~5 个长度不同的跨膜区域，每个亚基的第二个跨膜区共同构成 Na+通道的内壁。乙酰胆碱（Ach）的结合位点位于 α 亚基的 N 末端区域，每个亚基的胞外区域有糖基化位点，其中三个亚基的胞外段所具有的一组氨基酸，在确定通道对离子选择性过程中起关键的作用（图 12-1）。γ 氨基丁酸受体（γ-aminobutyric acid receptor，GABAR）、甘氨酸受体也是常见的Ⅰ型受体超家族成员，它们在跨膜区的结构、肽键的长度等方面与 nAchR 相似，其亚基的氨基酸组成上也与 nAchR 高度同源。通过其胞外区域与配体结合是Ⅰ型受体的共同特点。



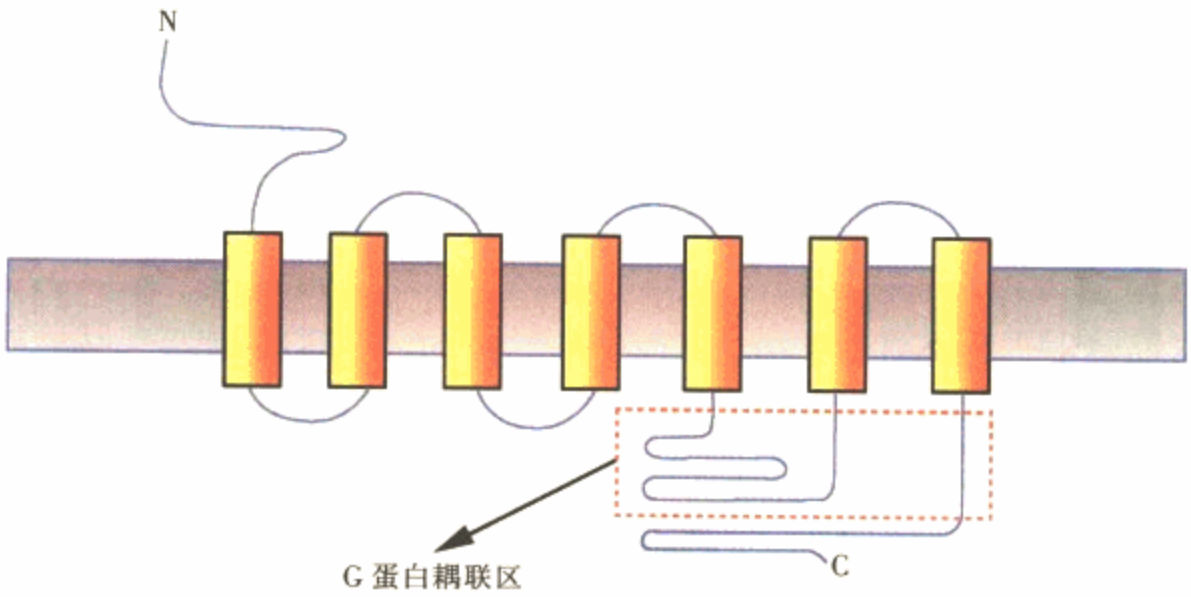
●图 12-1　N 型乙酰胆碱受体（nAchR）的结构

A. 乙酰胆碱受体 α1 亚单位跨膜示意图　B. 乙酰胆碱受体顶面观　C. 乙酰胆碱受体结构模式图

Ⅱ型及Ⅲ型受体超家族：此两类受体与Ⅰ型受体的不同之处在于，组成受体的亚基均有 6 个跨膜区域，其中有两个跨膜区的氨基酸组成具有高度同源性；受体与配体的结合部位在细胞膜，而不是在胞外。常见的Ⅱ型受体有光受体、嗅神经受体，而肌浆网膜上的 Ca^{2+}通道则属Ⅲ型受体。离子通道型受体因在结构上既可与细胞外信号分子结合，同时又是离子通道，因此具有受体与离子通道耦联的特点，所以当离子通道型受体与配体结合后，其离子通道可在极短的时间（数毫秒）内迅速打开，离子可通过胞膜流入或流出细胞，在胞内产生离子流和电效应，导致膜电位的变化。离子通道型受体介导的信号转导反应是一种快速的反应，为神经系统和其他电激发细胞如肌细胞所特有，主要在神经系统的突触反应中起控制作用。

2. G 蛋白耦联受体　G 蛋白耦联受体（G protein-coupled receptor）是膜受体中最大的家族，分布广泛、类型多样，受体家族成员达数千种，几乎遍布所有细胞。M-乙酰胆碱受体、视紫红质（rhodopsin）受体、α_2 和 β 肾上腺素受体等均属此类。G 蛋白耦联受体介导的信号转导过程较慢，但敏感、灵活，而且类型多样。

G 蛋白耦联受体成员均为一条多肽链构成的糖蛋白，由 400~500 个氨基酸残基组成，分为胞外、胞膜及胞内三个区。N 末端位于胞外区，带有多个糖基化位点；胞膜结构区由 7 个跨膜的疏水的 α 螺旋结构组成，其氨基酸组成高度保守，各跨膜螺旋结构之间有环状结构形成，共有 6 个（胞外、胞内各三个）；C 末端位于胞内区（图 12-2）。跨膜区的 α 螺旋结构片段是受体与配体结合的部位，位于胞质内的、跨膜第五及第六区间的细胞内环则是能被 G 蛋白识别的区域；当受体被激活时，这一区域将与 G 蛋白结合，进而使 G 蛋白



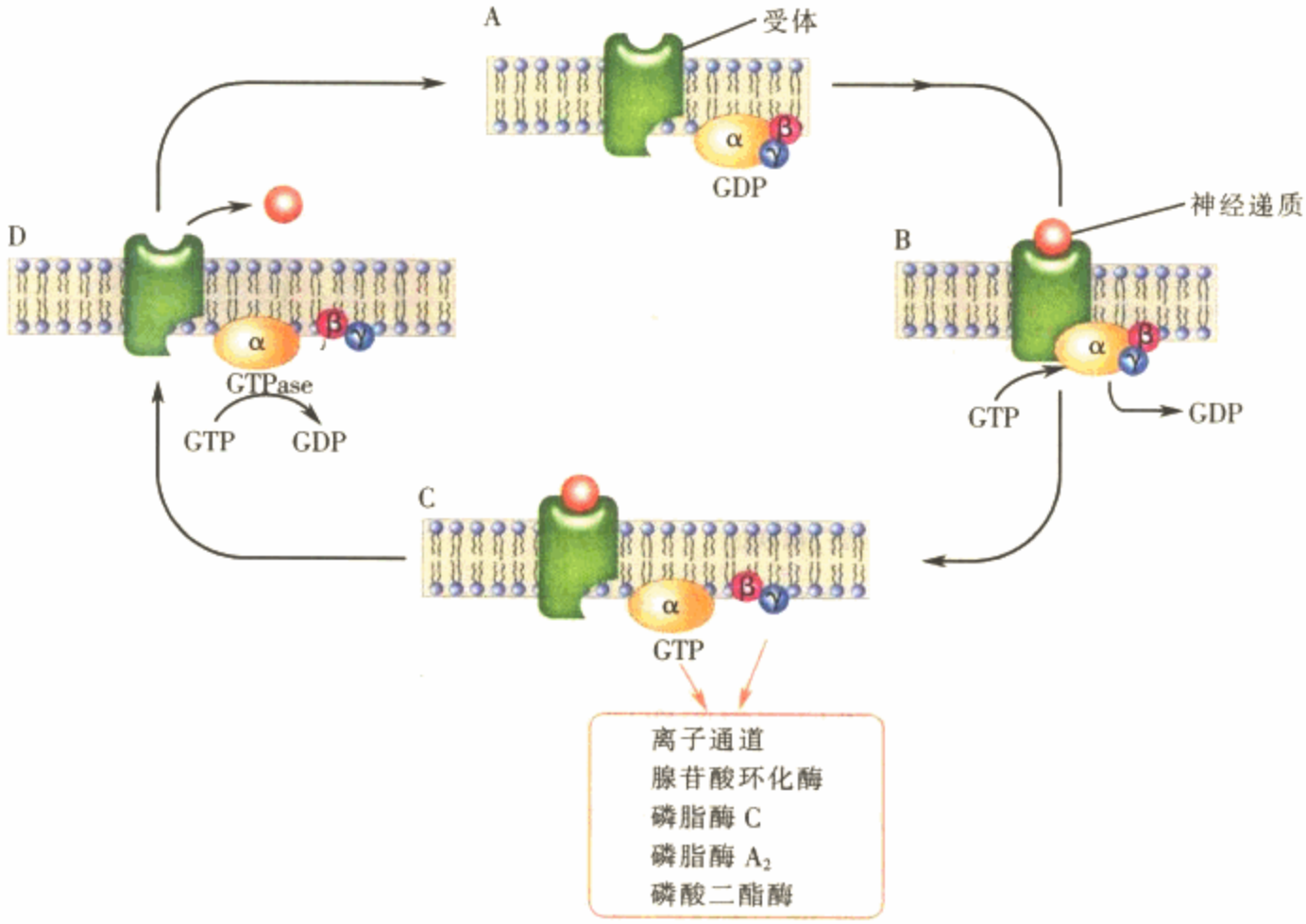
●图 12-2　G 蛋白耦联受体的结构

激活。如这一部位的氨基酸组成改变或数目减少，受体将不能与 G 蛋白耦联。C 末端的丝氨酸、苏氨酸为磷酸化部位，在蛋白激酶的作用下，可结合磷酸基团。

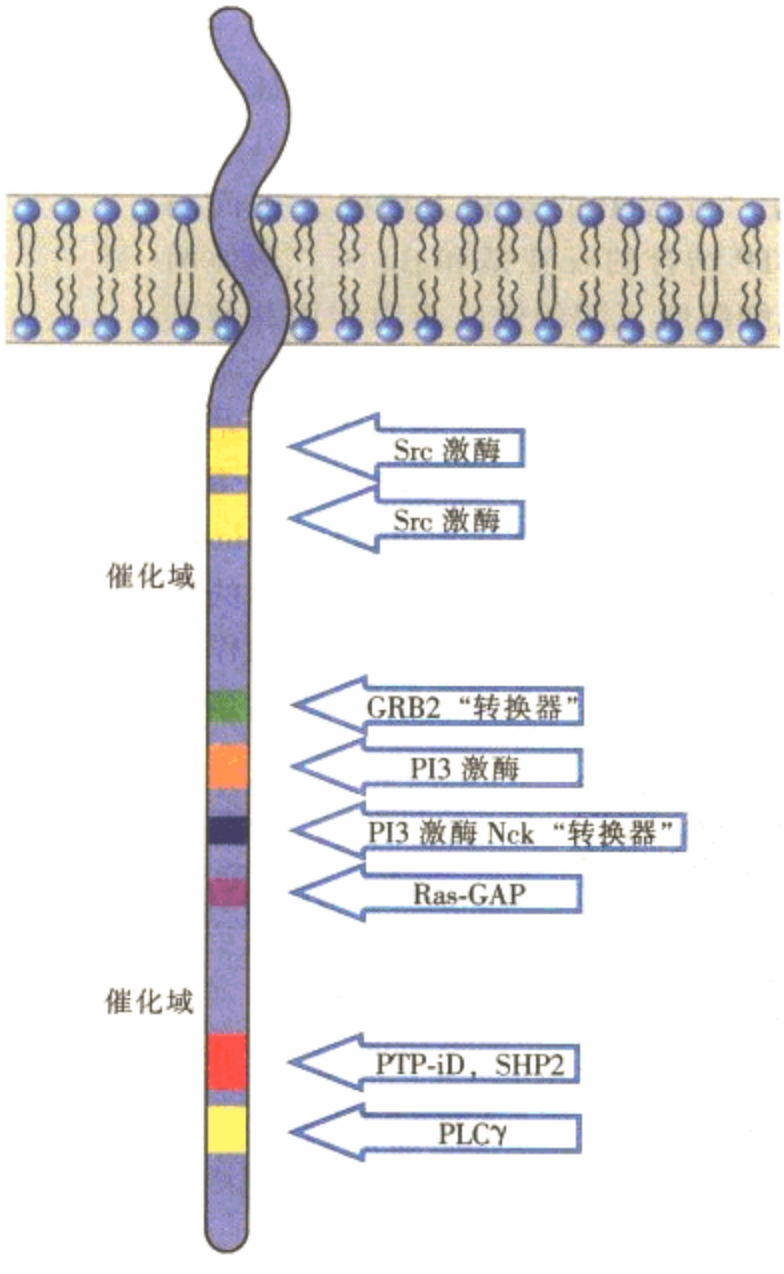
G 蛋白（G protein）是指在信号转导过程中，与受体耦联的并能与鸟苷酸结合的一类蛋白质，位于细胞膜胞质面，为可溶性的膜外周蛋白，由 α、β 和 γ 三种蛋白亚基组成。G 蛋白的主要功能是通过其自身构象的变化激活效应蛋白（effector protein），进而实现信号从胞外向胞内的传递。每一个 G 蛋白都与一个特殊的受体和一个具有特殊结构的下游靶蛋白有特定的结合关系。G 蛋白 α 亚基上存在 GDP 或 GTP 结合位点，有 GTP 酶活性，能促进与其结合的 GTP 分解为 GDP。在静息状态下，α 亚基与 β、γ 亚基形成三聚体形式后与 GDP 结合。此时 G 蛋白与受体分离，无活性，当配体与相应的受体结合后，受体分子的构象改变，与 G 蛋白 α 亚基结合的位点暴露，导致受体胞内部分与 G 蛋白 α 亚基接触并相互作用，α 亚基构象改变，与 GDP 的亲和力减弱，与 GTP 的亲和力增强，进而与 GTP 结合，G 蛋白被激活，进入功能状态并解体为与 GTP 结合的 α 亚基和 β、γ 二聚体两个部分，这两个分子沿着细胞膜自由扩散，直接与位于细胞膜下游的效应蛋白作用并使其激活，完成将信号从胞外传递到胞内的过程。当配体与受体结合解除后，G 蛋白 α 亚基分解其结合的 GTP，生成 GDP，其构象改变，与 GDP 的亲和力增加并与之结合，α 亚基与效应蛋白分离，重新与 β、γ 亚基构成三聚体，G 蛋白回复到静息状态（图 12-3）。G 蛋白下游效应蛋白通常是离子通道或与膜结合的酶，通常为腺苷酸环化酶（adenylate cyclase，AC）、磷脂酶 C（phospholipase C，PLC）等，不同的效应蛋白受不同类型的 G 蛋白的影响。在哺乳动物中已发现 20 多种不同类型的 G 蛋白，根据其在功能上对效应蛋白的作用不同，可分为激动型 G 蛋白（Gs 家族）、抑制型 G 蛋白（Gi 家族）和磷脂酶 C 型 G 蛋白（Gp）家族等类型，其生物学特性见表 12-2。

表 12-2　信号转导中 G 蛋白的生物学特性

G 蛋白种类	α 亚基	耦 联 受 体	对效应蛋白的作用
Gs	α_s	β-肾上腺素，降钙素及相关受体，胰高血糖素受体，组胺 H2 受体，ACTH 受体，LH 受体，嘌呤 2 受体	激活腺苷酸环化酶 激活 Ca^{2+} 通道 抑制 Na^+ 通道
Gi	α_i	α2 肾上腺素，血管紧张素，生长激素抑制受体，嘌呤 1 受体，DA2 受体	抑制腺苷酸环化酶
Gp	α_p	α1-肾上腺素，促甲肾上腺素，α-凝血酶受体，加压素受体，缓激肽受体，代谢型谷氨酸受体	激活磷脂酶 C



●图 12-3　G 蛋白作用过程示意图



●图 12-4　酪氨酸激酶活性区示意图

3. 酪氨酸蛋白激酶型受体　酪氨酸蛋白激酶型受体（tyrosine-specific protein kinase receptor，TPKR），是一类本身具有酪氨酸激酶活性的受体，为一条多肽链构成的跨膜糖蛋白，N 端位于胞外区，是配体结合部位。胞外区由 500~850 个氨基酸组成，较其他受体大，不同的 TPKR 胞外区氨基酸种类差别较大。C 端位于胞质内，含酪氨酸激酶功能区，该区在氨基酸组成上高度保守，包括结合 ATP 与结合底物两个区域，跨膜区由一个高度疏水的 α-螺旋构成，由 22~26 个氨基酸组成（图 12-4）。当配体与受体结合后，受体的胞外结构域构象改变，引起其胞内结构域构象发生变化，使受体 C 端酪氨酸残基被迅速磷酸化，激活受体的激酶，在空间结构上形成一个或数个 SH2 结合位点（SH2 binding site），通过这些位点，受体可与具有 SH2 结构域（Src 同源序列 2 结构域的简称）的蛋白质结合并使之激活，激活的蛋白质进一步催化细胞内的生化反应，由此完成信号从胞外向胞内的传递。由于酪氨酸蛋白激酶型受体的配体主要为一些生长因子和分化因子，如表皮生长因子（epidermal growth factor，EGF）、血小板源生长因子（platelet-derived growth factor，PDGF）和胰岛素（insulin）等，因此这类受体介导的信号转导途径在参与细胞生长和分化的调控中起

着重要的作用。不过，它们引起细胞产生效应的过程较缓慢，一般需数分钟。

（二）胞内受体根据其在细胞中的分布情况分为胞浆受体和核受体

胞内受体通常为400~1 000个氨基酸组成的单体蛋白，其N末端的氨基酸序列高度可变，长度不一，具有转录激活作用，该区域也是抗体结合区；其C端由200多个氨基酸组成，是配体结合的区域，对受体的二聚化及转录激活也有重要作用，其DNA结合区域由66~68个氨基酸残基组成，富含半胱氨酸残基，因有两个锌指结构，故可与DNA结合。配体结合区与DNA结合区之间为铰链区，这一序列较短，其功能尚未完全明确。胞内受体的配体多为脂溶性小分子甾体类激素，以类固醇激素类较为常见，此外还包括甲状腺素类激素、维生素D等，这些分子可直接以简单扩散的方式或借助于某些载体蛋白跨越靶细胞膜，与位于胞质或胞核内的胞内受体结合。不同的胞内受体在细胞中的分布情况可不同，如糖皮质激素和盐皮质激素的受体位于胞浆中，称为胞浆受体；而维生素D_3及维甲酸受体则存在于胞核，称为核受体；还有一些受体可同时存在于胞浆及胞核中，如雌激素受体、雄激素受体等。胞内受体是基因转录调节蛋白，在与配体结合后，其分子构象发生改变，进入功能活化状态，其DNA结合区与DNA分子上的激素调节元件（hormone regulatory elements，HRE）相结合，通过稳定或干扰转录因子对DNA序列的结合，选择性地促进或抑制基因转录。由胞内受体介导的信号转导反应过程很长，细胞产生效应一般需经历数小时至数天。

二、受体作用的特点

受体能特异性识别和结合相应的配体，在与配体结合后，可将其相互作用的信号向其他信号分子传递，使细胞产生生物学效应。

受体与配体的结合具有下列几个特点：

1. 受体能选择性地与特定配体结合　受体分子的立体构型是决定这一特点的关键，受体可通过与配体分子中反应基团的定位和空间结构互补，准确识别配体并与其特异地结合。一个配体可以与几种受体结合。

2. 配体具备强的亲和力　受体与配体的结合力极强，极低浓度的配体与受体结合后，即可产生显著的生物学效应。对不同的受体和配体而言，亲和力的大小差别很大。

3. 受体-配体结合后显示可饱和性　随着配体浓度的升高，受体被配体完全结合后，就不再结合其他配体。这是细胞控制其对胞外信号反应程度的一种方式。受体的数量相对恒定及受体对配体的较高亲和力是受体饱和性产生的基础。虽然不同的受体或同一种受体在不同类型细胞中的数量差异较大，但某一特定的受体在特定细胞中的数量，却相对恒定。

4. 受体-配体的结合具有可逆性　受体与配体的结合与解离处于可逆的动态平衡中。受体与配体以氢键、离子键和范德华键等非共价键结合，在细胞发生效应后，二者解离，配体被灭活，受体可再次被利用。

5. 受体与配体的结合可通过磷酸化和去磷酸化进行调节　受体与配体的结合可受多种因素的影响，主要涉及受体的数目及受体与配体的亲和力，常见的调节机制为受体的磷酸化与去磷酸化，如EGF受体酪氨酸残基的磷酸化，可促进其与EGF的结合。而类固醇类激素在磷酸化后，与配体的结合能力却明显减弱。

第三节　细胞内信使

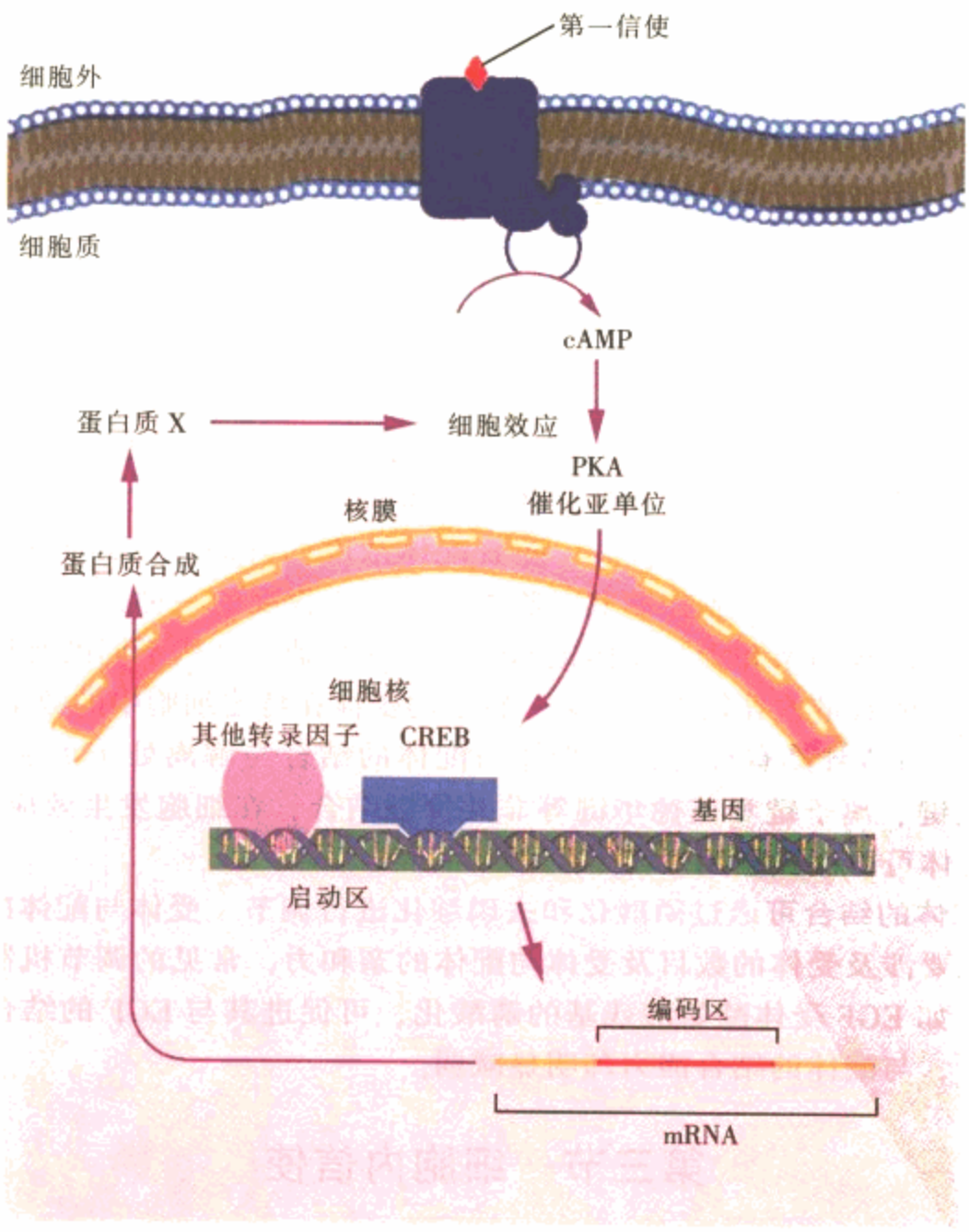
细胞内信使是指受体被激活后在细胞内产生的、能介导信号转导的活性物质，又称为

第二信使（second messenger）。已经发现的细胞内信使有许多种，其中最重要的有：cAMP、cGMP、二酯酰甘油（diacylglycerol，DAG）、三磷酸肌醇（inositol trisphosphate，IP3）和钙离子等。

一、cAMP 信使体系

环磷酸腺苷（cyclic AMP，cAMP）是最重要的胞内信使，它是细胞膜的腺苷酸环化酶（adenylate cyclase，AC）在 G 蛋白激活下，催化 ATP 脱去一个焦磷酸后的产物。cAMP 可被特异的环核苷酸磷酸二酯酶迅速水解为 5′-AMP，失去信号功能。

cAMP 的主要作用是激活依赖 cAMP 的蛋白激酶 A（cAMP-dependent protein kinase A，PKA），进而使下游信号蛋白丝氨酸/苏氨酸残基的磷酸化被激活或钝化（图 12-5）。cAMP 的作用还涉及对离子通道通透性的调节。AC 是一种由 1 100 个氨基酸组成的、分子量为 150kD 的糖蛋白，由 2 个大的疏水区域（M1、M2）及 2 个胞质区域（C1、C2）组成，每一疏水区域均跨膜 6 次，而胞质区域是 ATP 结合及具酶活性的部位，其氨基酸组成高度



● 图 12-5　cAMP 通过 PKA 调节细胞代谢

保守（图 12-6）。AC 的主要功能是催化 ATP 生成 cAMP，这一过程不仅需经 G 蛋白激活，还需 Mg^{2+}、Mn^{2+}的存在。而当 AC 与 Gs 或 Gi 分离后，其酶的活性依然保留。PKA 是一种能被 cAMP 活化的蛋白激酶，是有催化亚基（C 亚基）和调节亚基（R 亚基）两部分组成的 C_2R_2 四聚体，分子量为 160kD。催化亚基能催化蛋白质上某些特定丝氨酸/苏氨酸残基的磷酸化，每个调节亚基则可与 2 个 cAMP 结合。当 PKA 与 4 分子 cAMP 结合后，C 亚基以单体的形式从 PKA 中游离出来后，即具有了蛋白激酶活性，通过使其蛋白底物磷酸化，进一步调节细胞的代谢反应（图 12-7）。PKA 对底物的特异性要求较低，因此催化的底物相当广泛。存在于胞核中的 cAMP 反应元件结合蛋白（cAMP response element binding protein，CREB）是能被 PKA 磷酸化的重要蛋白，当 PKA 被 cAMP 激活后，其游离的 C 亚基可从胞质进入胞核，通过使 CREB 丝氨酸残基磷酸化而激活它，进而参与基因的转录调节。此外，PKA 催化的蛋白质还包括组蛋白类和核糖体蛋白类等。PKA 广泛存在于哺乳动物细胞的胞浆内，在脑组织细胞的许多亚细胞结构中，例如突触结构内，存在高浓度的PKA。在某些细胞的核中也可检测到 PKA 的活性。已证实，一些神经递质及激素，如异丙肾上腺素，可诱导 PKA 的 C 亚基从胞浆迁入胞核，通过使组蛋白磷酸化影响相关蛋白的合成。PKA 作用的底物蛋白因细胞类型的不同而异，这导致了 cAMP 的生物学效应也不相同。如，cAMP 浓度上升可使成纤维细胞和造血细胞的增殖停止，但却使上皮细胞和内皮细胞增殖加速。推测各种细胞内预先存在有种类和数量各不相同的 PKA 底物，由此使得 PKA 作用底物下游的各条信号转导通路呈现差异。

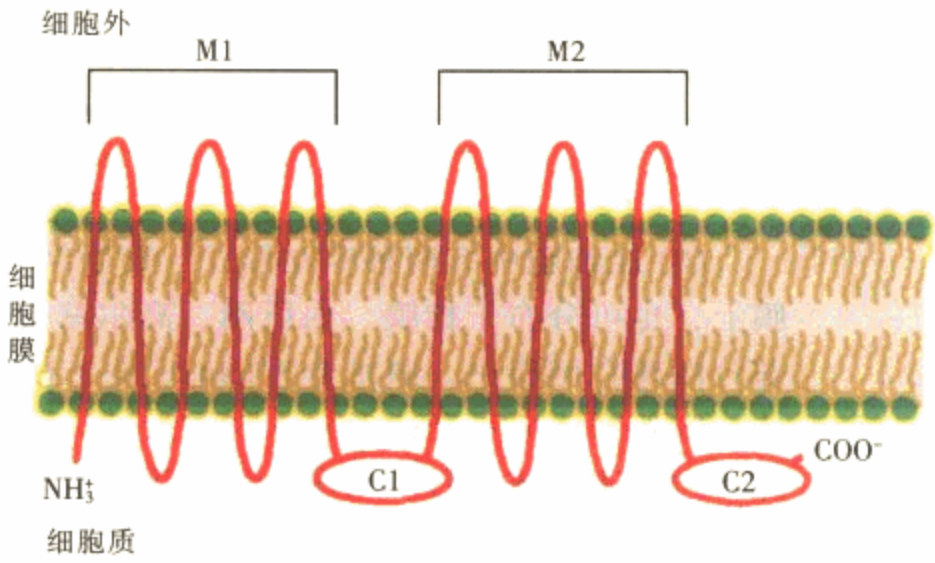


图 12-6　腺苷酸环化酶的分子结构

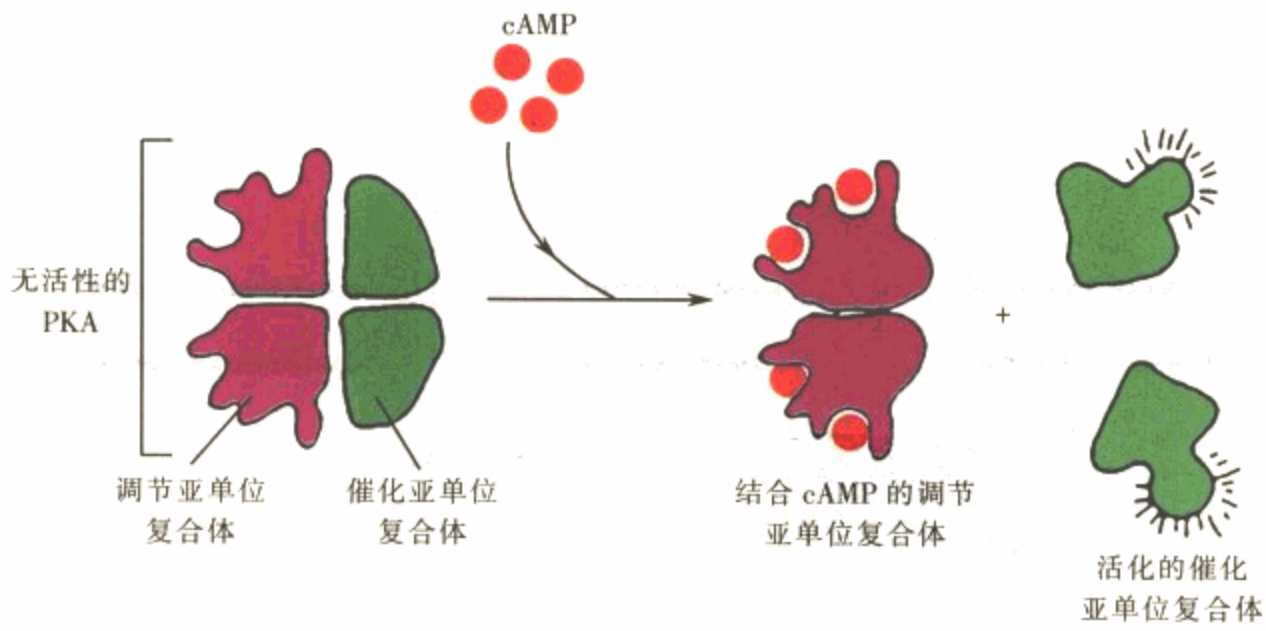
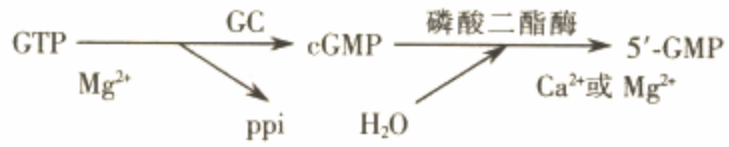


图 12-7　PKA 的活性依赖于 cAMP

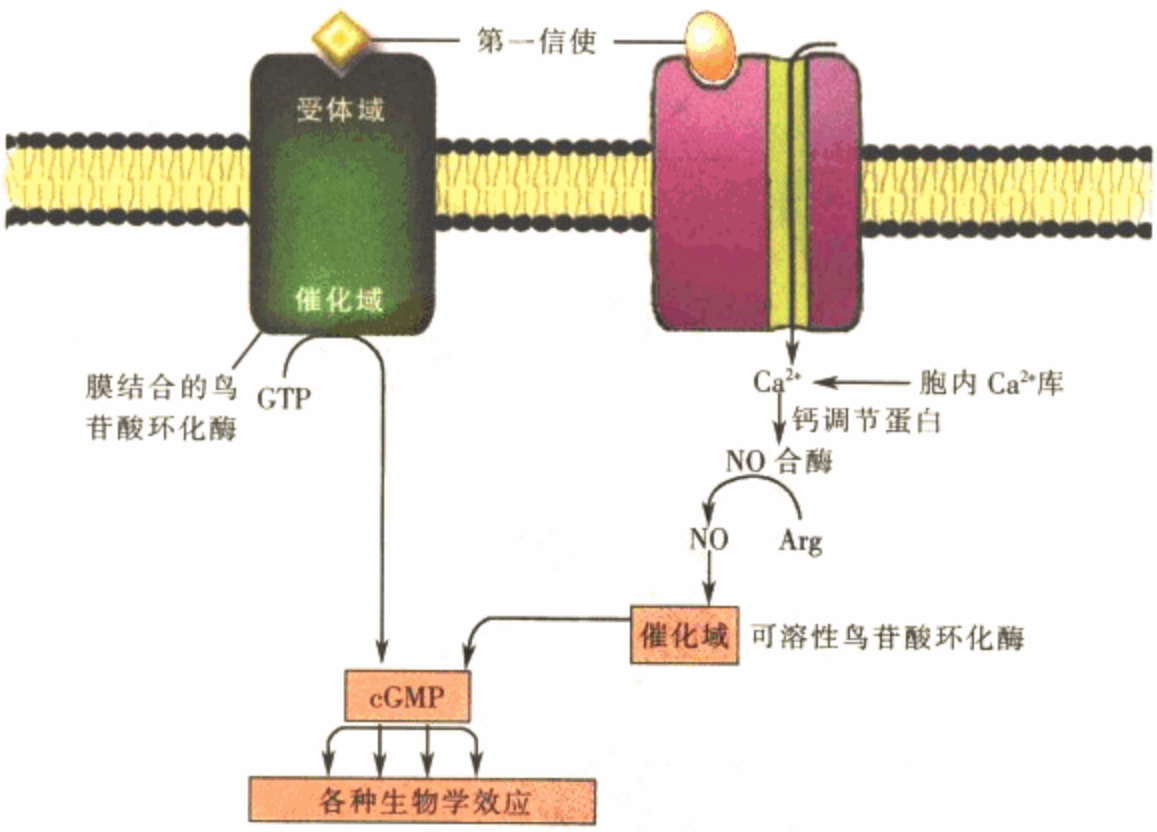
二、cGMP 信使体系

环磷酸鸟苷（cyclic GMP，cGMP）是一种广泛存在于动物细胞中的胞内信使，是由鸟苷酸环化酶（guanylate cyclase，GC）催化并水解 GTP 后形成。cGMP 可被细胞中的磷酸二酯酶（phosphodiesterase，PDE）水解，因此细胞中 cGMP 的含量高低受 GC 与 PDE 的双

重调节。



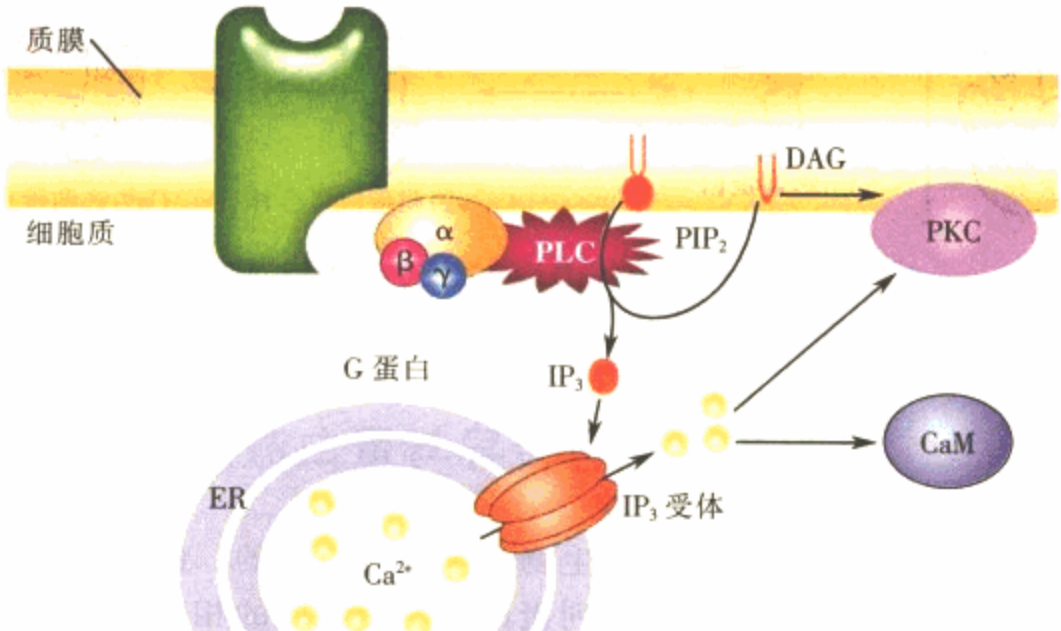
GC 在细胞中有两种存在形式，即膜结合型 GC 和胞浆可溶型 GC，前者主要结合于胞膜上，也可分布于核膜、内质网、高尔基复合体和线粒体等膜性结构中；而可溶型 GC 大部分游离在胞质中。膜结合型的 GC 是一种单次跨膜蛋白，在结构上类似于酪氨酸激酶受体，胞外结构域是受体部分，膜内为鸟苷酸环化酶催化域。当胞外受体与配体（主要为神经肽类物质）结合后，胞内的酶催化活性即被激活，催化 GTP 转化成 cGMP。溶解于胞质中并呈颗粒状的 GC 由两个亚单位组成，具有两个酶活性部位，可在 NO、CO 的作用下被激活。两种 GC 在分布上呈现出组织差异，膜结合型 GC 常存在于心血管组织细胞、小肠、精子及视网膜杆状细胞中，而可溶型 GC 则主要分布于在脑、肺、肝等组织中；在同一种细胞中，随着细胞生长过程的变化，两种 GC 的比例可发生改变，如，与幼鼠相比，成年鼠肝细胞中可溶型 GC 的活性明显增高，而膜结合型的 GC 的活性却降低。在细胞中，cGMP 形成后可通过激活 cGMP 依赖蛋白激酶 G（cGMP dependent protein kinase G，PKG），使相应的蛋白质磷酸化，引起细胞效应。PKG 是一个二聚体，在结构上由具有催化活性的亚基和具有结合 cGMP 活性的调节亚基组成。由于 PKG 的分子量与分子形状与 PKA 类似，其氨基酸组成约有 70%~90%与 PKA 相同，因而被认为与 PKA 同源。PKG 催化的底物蛋白主要涉及组蛋白、磷酸化酶激酶、糖原合成酶及丙酮酸激酶等；催化的相关机制及产生的细胞效应均有待进一步的阐明。PKG 还可通过其磷酸转移酶作用，使自身磷酸化，进而通过抑制方式来调节其自身活性。在脊椎动物的视杆细胞中，cGMP 可直接作用于 Na^+离子通道，在有光信号存在的情况下，使 Na^+离子通道关闭，引起胞内超极化，神经递质释放减少，产生视觉反应。因此，cGMP 在光信号的转导中起着重要作用。cGMP 在细胞中的含量较低，仅为 cAMP 的 1/10~1/100，而 cGMP 在浓度与作用上呈现出与 cAMP 相拮抗的特点，如 cAMP 浓度升高，细胞内特异性蛋白质合成的进程加快，细胞分化受到促进；而 cGMP 浓度升高则可加速细胞 DNA 复制，进而促进细胞的分裂（图 12-8）。



● 图 12-8　cGMP 通过蛋白激酶 G 介导的细胞效应

三、二酯酰甘油/三磷酸肌醇信使体系

细胞外的某些信号分子与其相应的受体结合后，通过膜上特定的 G 蛋白激活磷脂酶 C（phospholipase C，PLC），催化胞膜脂质内层的 4,5-二磷酸酯酰肌醇（phosphatidylinosital-4,5-biphosphate，PIP2）水解，产生 IP3 和 DAG 两种胞内信使。IP3 是一种水溶性分子，在其产生后即可从胞膜扩散至胞质中，与内质网膜上的受体结合，使膜上的 Ca^{2+}离子通道开放，Ca^{2+}从内质网释放入胞浆，启动细胞内 Ca^{2+}信号系统，使细胞产生相应的反应；脂溶性的 DAG 生成后仍留于胞膜上，在有 Ca^{2+}、磷脂酰丝氨酸存在的情况下，激活蛋白激酶 C（protein kinase C，PKC），PKC 以磷酸化的方式对多种胞内蛋白质进行修饰，由此启动细胞的一系列生理和生化反应。（图 12-9）



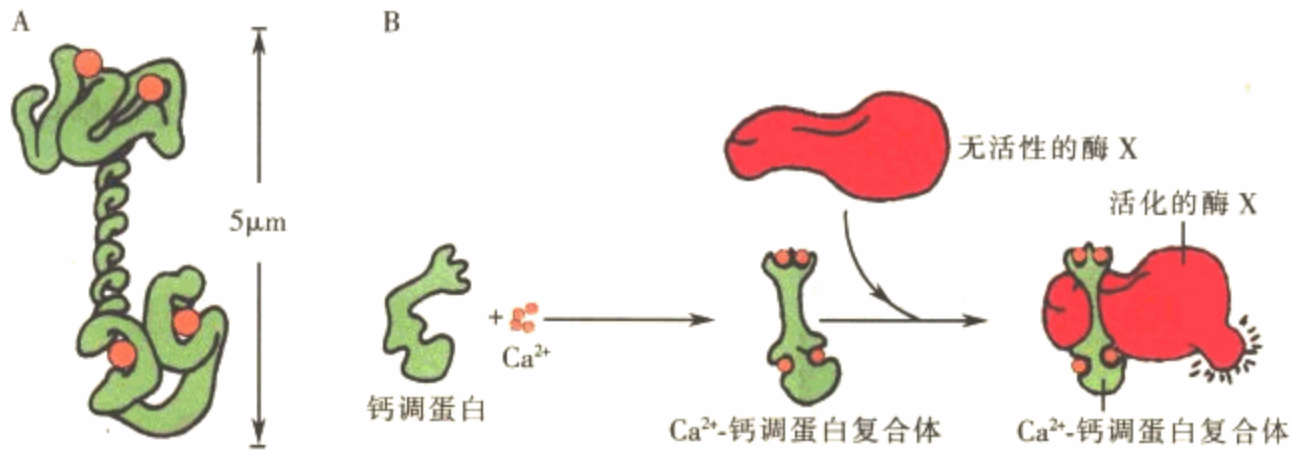
●图 12-9　二酯酰甘油/三磷酸肌醇信使介导的细胞效应

四、钙离子/钙调蛋白信使体系

在细胞收缩、运动、分泌和分裂等重要活动中，均需要钙离子的参与及调节。钙离子的信使作用是通过其浓度的升高或降低来实现的。细胞内游离钙离子的浓度是 10^{-8}~10^{-7}mol/L，比胞外钙离子浓度低 10^{4}~10^{5} 倍；当细胞受到特异性信号刺激后，细胞内钙库(内质网、肌浆网等）的钙通道或质膜上的钙通道开放，致使胞内钙离子的浓度在瞬时快速升高，可达 10^{-6}mol/L，由此产生的钙信号使细胞内某些酶的活性和蛋白质功能发生改变，进而产生细胞效应。不同的细胞钙信号产生的途径存在差异，神经细胞中，胞膜钙通道开放是产生 Ca^{2+}信号的主要途径；而在肌细胞中，Ca^{2+}信号则依赖于钙库钙通道及胞膜钙通道同时开放。同其他胞内信使一样，钙离子需要与其靶蛋白或靶酶结合才能传递信息，产生细胞效应。

细胞中有多种能够与钙离子结合的、功能复杂的蛋白质，钙调蛋白（calmodulin，CaM）是其中最主要的一种。CaM 广泛分布于真核细胞中，由一条多肽链组成，分子量为 16.7kD，呈哑铃形构象，每一个分子的 CaM 可以结合 4 个钙离子，当细胞中钙离子浓度超过 10^{-6}mol/L 时，无活性的 CaM 即可与钙离子结合，使其构象发生改变而被活化，由此

激活靶蛋白或靶酶（图 12-10）。钙离子-CaM 复合物激活的酶主要包括蛋白质磷酸化酶激酶（phosphorylase kinase，PhK）、肌球蛋白轻链激酶（myosin light chain kinase，MLCK）及钙调蛋白依赖性蛋白激酶（CaM-dependent protein kinase，CaM-PK）三种类型。CaM 本身还可通过激活细胞膜上的 Ca^{2+}泵，调节细胞内的 Ca^{2+}浓度。Ca^{2+}也可直接对离子通道进行调节，如活化多种组织细胞胞膜的 K^+离子通道，致使 K^+顺着电化学梯度扩散到细胞外，胞膜处于超极化状态。一些非专一性的阳离子通道，在受到 Ca^{2+}的活化后，对 Na^+、K^+的通透性增加。



● 图 12-10　Ca^{2+}-钙调蛋白复合体的分子结构及对酶的调节

A. Ca^{2+}-钙调蛋白复合体　B. Ca^{2+}-钙调蛋白复合体活化酶

第四节　信号转导与蛋白激酶

细胞内信号转导过程是由前后相连的生物化学反应组成的，前一个反应的产物可作为下一个反应的底物或者发动者，通过一系列蛋白质与蛋白质的相互作用，信息可从胞内一个信号分子传递到另一个信号分子，每一个信号分子都能够激起下一个信号分子的产生，直至产生代谢酶被激活、基因表达被启动和细胞骨架产生变化等细胞生理效应。

一、信号转导的特点

胞内信号转导的特点概括如下：

1. 信号转导分子激活机制的类同性　蛋白质的磷酸化和去磷酸化，是绝大多数信号分子可逆地激活的共同机制，如，Fos 的激活需要其丝氨酸和苏氨酸的磷酸化；JAK 的激活需要其酪氨酸磷酸化，在传递信息后又都要去磷酸化。

2. 信号转导过程中的级联式反应　信号转导过程中的各个反应相互衔接，形成一个级联反应过程。细胞外信号从膜上受体到胞内的信号转导和基因调节过程中，经历了多次的信号转换后信号得以强化，使少数细胞外的微弱信号分子足以激起一个较显著的反应。如在 cAMP 蛋白激酶途径中，一个信号分子可与多个受体结合，活化的受体则可作用于数个 G 蛋白，每一个 G 蛋白又能调节多个效应酶，由此产生大量的胞内信使，进一步磷酸化其他靶蛋白，使细胞产生明显的效应。

3. 信号转导途径具有通用性与特异性　信号转导途径的通用性是指同一条信号转导途径可在细胞的多种功能效应中发挥作用。如 cAMP 途径不仅可介导胞外信号对细胞生长和分化产生效应，也可在物质代谢的调节和神经递质的释放等方面起作用，使得信号转导途径呈现出保守和经济的特点，这是生物进化的结果。介导信号需要精细地调节细胞功能，信号转导途径必须具有特异性，其产生的基础首先是受体的特异性，如生长因子受体的

TPK 活性，能在生长因子刺激的细胞增殖中起独特的作用。此外，与信号转导相关的蛋白质，如 G 蛋白家族及各种类型的 PKC、TPK，它们在结构及分布等方面的多样性，以及它们作用发生的时间，对于信号转导途径的特异性形成均具有一定的影响。

4，胞内信号转导途径的相互交叉　由于参与信号转导的分子大多数都有复杂的异构体和同工酶，它们对上游的激活条件要求不相同，而对其下游底物分子的识别也有差别，使得各信号转导途径之间可相互交叉及影响，形成复杂的信号网络，共同协调机体的生命活动，具体包括以下两种情况：

（1）一条信号转导途径的成员可激活或抑制另一条信号转导途径，如促甲肾上腺素与其受体结合后，不仅可以通过钙离子-二酯酰甘油/三磷酸肌醇信使体系激活 PKC，而且还可以因 Ca^{2+}浓度的升高，激活腺苷酸环化酶，促进 cAMP 的生成，进而使 PKA 激活。

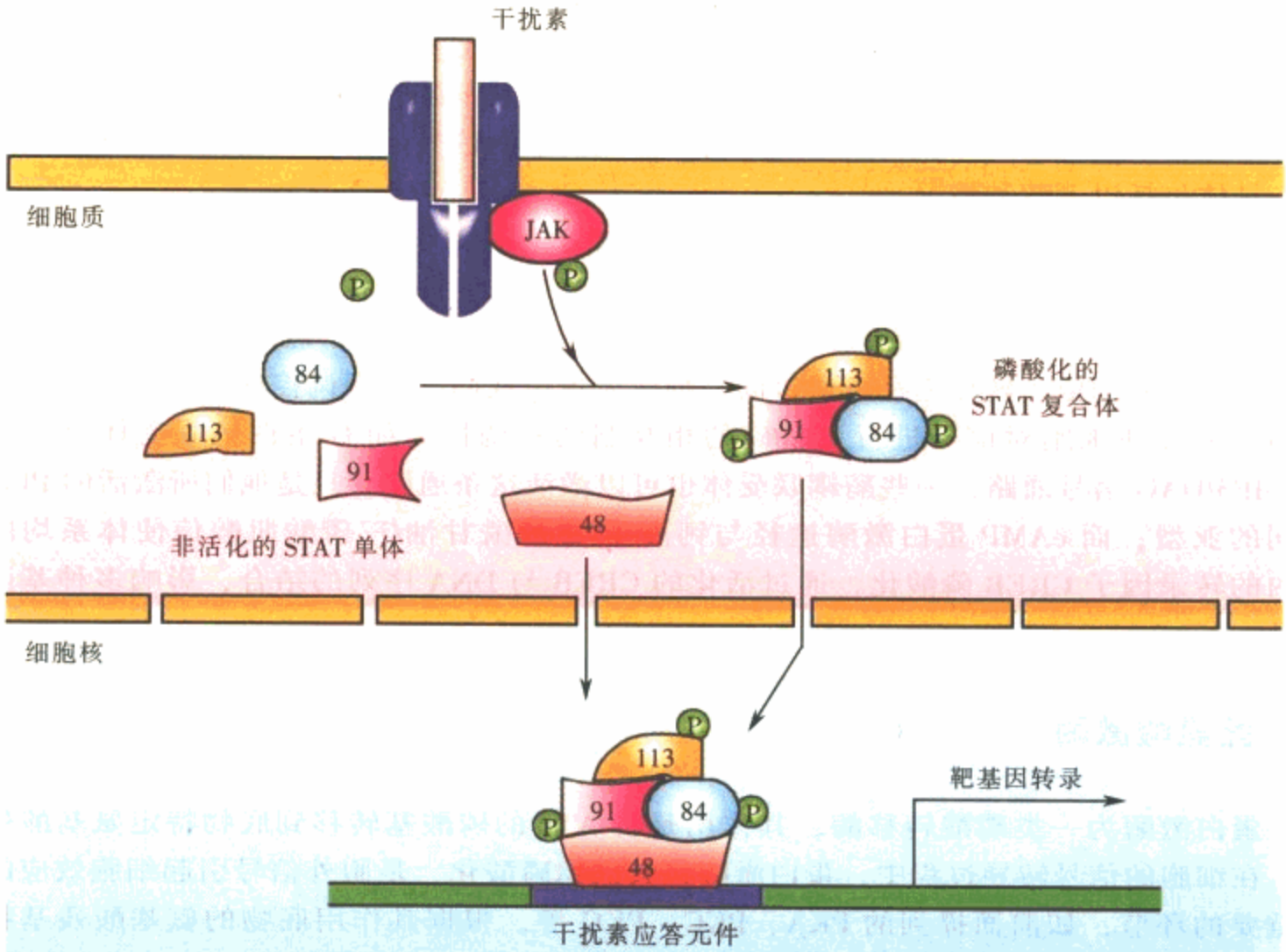
（2）不同的信号转导途径可通过同一种效应蛋白或同一基因调控区，彼此协调地发挥作用，从而使细胞对信号进行更精确的相互制约和调控。如 G 蛋白耦联受体可以激活 PLC-IP3/DAG 信号通路，一些酶耦联受体也可以激活这条通路，只是他们所激活的 PLC 是不同的亚型；而 cAMP 蛋白激酶途径与钙离子-二酯酰甘油/三磷酸肌醇信使体系均能使胞内的转录因子 CREB 磷酸化，通过活化的 CREB 与 DNA 序列的结合，影响多种基因的转录。

二、酪氨酸激酶

蛋白激酶为一类磷酸转移酶，其作用是将 ATP 的磷酸基转移到底物特定氨基酸残基上。在细胞的信号转导过程中，蛋白激酶将其底物磷酸化，是胞外信号引起细胞效应的一个重要的环节，如前面提到的 PKA、PKC、PKG 等。根据其作用底物的氨基酸残基特异性，可将信号转导过程中的蛋白激酶分为两类，即蛋白质酪氨酸激酶、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶。

蛋白酪氨酸激酶（protein tyrosine kinase，PTK），是一类激活后可催化底物蛋白酪氨酸残基磷酸化的激酶，为蛋白激酶家族中最重要的成员之一，对细胞生长、增殖和分化等过程起重要的调节作用。这类激酶包括两大类，即前述的位于细胞膜上的受体型 PTK 和位于胞质中非受体型 PTK。受体型 PTK 是酪氨酸激酶家族中目前了解最多的一种类型。其共同的特点是胞内域都有一个或者几个专一的酪氨酸残基，当与配体结合后，其胞内域可发生自身磷酸化，而活化的受体型 PTK 则进一步作用于 ras 蛋白、腺苷酸环化酶和多种磷脂酶等底物。非受体型 PTK 有 9 个亚族，JAK 是其中一个主要的 PTK 亚族，这些成员在结构上都含有特殊的保守性结构域，例如 SH_2 和 SH_3 同源域等，这些结构域可在信号转导中起重要作用。非受体型 PTK 常与一些非催化型的受体耦联，在信号转导中起作用，如干扰素、生长激素、白介素和集落刺激因子等胞外信号分子的受体以及部分黏附分子的受体，它们的胞内结构域中没有酪氨酸蛋白激酶活性区域，本身缺乏酪氨酸激酶活性，但在胞内近膜区有一个富含脯氨酸（Pro）的“Box1”结构，是 JAK 的结合位点。当这些受体与配体结合后，可使 JAK 活化，并进一步激活与转录相关的调节蛋白，由此影响基因的转录。转录因子 STAT 家族是 JAK 激酶作用的主要的下游蛋白，其 C 端含有一个高度保守的 SH_2 结构域，是与 JAK 作用的区域，STAT 的磷酸化一般发生在 C 末端的酪氨酸残基上。与 DNA 结合的区域位于 STAT 分子的中间，STAT 的 N 端相对保守，该区域对于 STAT 的磷酸化具有重要意义，若发生很小的缺失，STAT 将失去被磷酸化的能力。STAT 的家族成员在组成上具有高度同源性，激活的两个 STAT 蛋白是通过一个的磷酸化酪氨酸残基与另一个的 SH_2 结构域相互作用，形成稳定的 STAT 异源复合体，这有利于 STAT 蛋

白穿越核膜，进而与 DNA 结合。若 SH_2 结构域或酪氨酸磷酸化位点发生突变，STAT 复合体将不能形成，其功能可因此受到影响（图 12-11）。



●图 12-11　干扰素诱导 JAK、STAT 复合体及调节基因转录机制

经典实验：Src 蛋白酪氨酸激酶活性的发现

研究背景

劳斯肉瘤病毒（Rous sarcoma virus，RSV）是第一个被分离的能引起动物肿瘤的病毒。研究人员从 RSV 的基因组中发现了一个在 RSV 诱导肿瘤发生的过程中起关键性的作用的癌基因，即 *src* 基因（sarcoma 的缩写）。更为重要的是，在各种脊椎动物（包括人类）的正常基因组中也发现了与病毒 src 同源的基因。1977 年，Ray Erikson 和他的同事利用抗血清，通过免疫沉淀方法分离得到了 Src 蛋白。随后又发现，Src 的免疫沉淀物在 ATP 存在时可导致免疫球蛋白分子的磷酸化。因此，推测 Src 可能是一种蛋白激酶，但 Src 作为蛋白激酶的本质不明。Tony Hunter 和 Bartholomew M.Sefton 对 Src 可以磷酸化底物蛋白中的哪种氨基酸残基（是酪氨酸残基还是丝/苏氨酸残基）进行了研究。他们的实验表明，Src 具有蛋白酪氨酸激酶的功能。

实验内容

Hunter 和 Sefton 将底物蛋白（免疫球蛋白分子）与 Src 免疫沉淀物和 ^{32}P 标记的 ATP 共同孵育。这样一来，底物蛋白中被 Src 磷酸化后的氨基酸残基就具有了放射性标记。然后，他们分离底物蛋白并使其水解形成单个氨基酸，进一步通过电泳、层析的方法分离磷酸化的酪氨酸、丝氨酸及苏氨酸。发现所检测到的具有放射性的氨基酸是酪氨

酸，这表明 Src 能特异性地磷酸化底物蛋白中的酪氨酸残基。进一步实验显示，正常细胞的 Src 蛋白和病毒 Src 蛋白都具有酪氨酸激酶的活性。

另外，Hunter 和 Sefton 通过体外实验也证实了细胞总蛋白中磷酸化酪氨酸的存在。正常细胞中，磷酸化的酪氨酸只占整个细胞中磷酸化氨基酸的 0.03%（其余是磷酸化的丝氨酸和苏氨酸），这也正是过去它不易被检测到的原因。而在受 RSV 感染的细胞中，磷酸化酪氨酸的含量升高了十倍之多，这表明，蛋白酪氨酸激酶活性的增加能够诱导细胞的非正常增殖。

发表论文

Tony Hunter and Bartholomew M. Sefton（The Salk Institute，San Diego，USA）：

Transforming gene product of Rous Sarcoma Virus phosphorylates tyrosine. Proc.Natl. Acad. Sci. USA，1980，77：1311-1315

后续影响

Src 是蛋白酪氨酸激酶这一发现不仅确定了一种新的蛋白酪氨酸激酶，而且发现酪氨酸激酶活性与细胞增殖的调控密切相关。继 Hunter 和 Sefton 的结果之后又有一系列类似的发现：许多其他肿瘤病毒蛋白也有蛋白酪氨酸激酶的功能，从而总结出了蛋白酪氨酸磷酸化和癌细胞的非正常增殖之间的联系。后续的研究发现，EGF 受体是一种蛋白酪氨酸激酶，这直接证明了蛋白酪氨酸磷酸化在正常细胞增殖调控中的作用。自此，受体型和非受体型蛋白酪氨酸激酶的不断发现，促进了对细胞信号转导通路机制的认识。到目前为止，由原癌基因编码的蛋白酪氨酸激酶已为癌细胞特异性药物的开发提供了潜在的靶标。

三、丝氨酸/苏氨酸激酶

丝氨酸/苏氨酸激酶（serine/threonine kinase，STK）的主要作用是通过变构而激活蛋白质，催化底物蛋白丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化，PKA、PKC、PKG、钙调蛋白依赖性蛋白激酶（calmodulin-dependent protein kinases，CaMK）和丝裂原激活蛋白激酶（mitogen-activated protein kinases，MAPK）等均属此类。此外，还包括许多其他种类，如 Raf-1 是已知的能够激活 MAPKK 的细胞激酶之一，在细胞对刺激产生增殖反应的 ras 信号转导通路中起着关键作用。被激活的 Ras（即 Ras-GTP）就结合在 Raf-1 的 N 末端域上。在与Ras-GTP 结合并且其酪氨酸被磷酸化后，Raf-1 就激活 MAPKK。蛋白激酶催化蛋白磷酸化的过程是可逆的，磷酸化的蛋白质在磷酸酶的作用下可以发生去磷酸化，蛋白激酶与磷酸酶的相对活性决定了蛋白质上磷酸基团的数量。此外，在细胞信号转导的过程中，许多胞内信号分子自身就是蛋白激酶，而它本身又可被上游的蛋白激酶磷酸化而激活，由此引起细胞内一系列蛋白质的磷酸化，产生级联效应（cascade），胞外信号分子所产生的信号便由此被逐渐放大，在短时间内引起细胞效应。如血中低浓度的肾上腺素（10^{-10}mol/L）在引起肝细胞内cAMP 浓度升高后，cAMP 激活 PKA，PKA 可进一步激活磷酸化酶的激酶，最后可引起磷酸化酶的活化，由它分解糖原，产生的葡萄糖进入血液后，导致血糖的升高，而在上述过程中，信号被放大了 10^8 倍(图 12-12)。

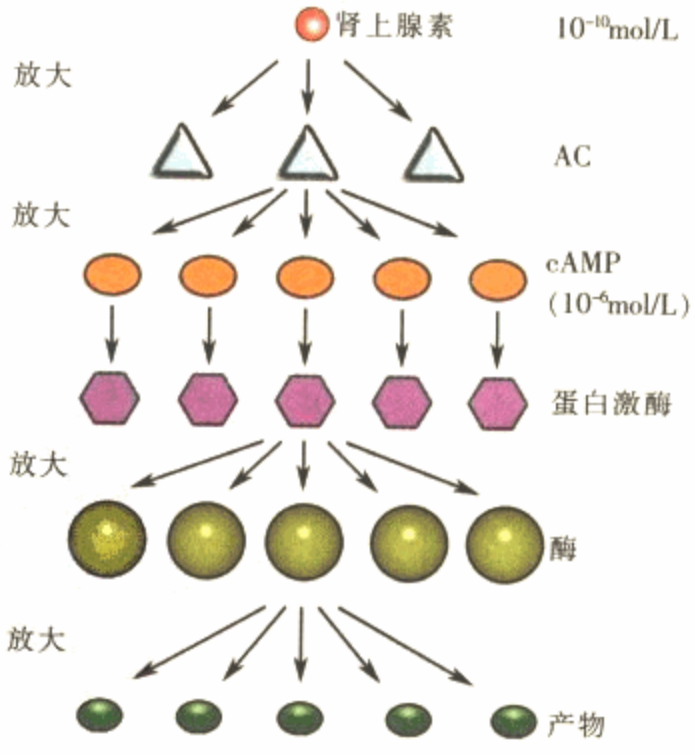


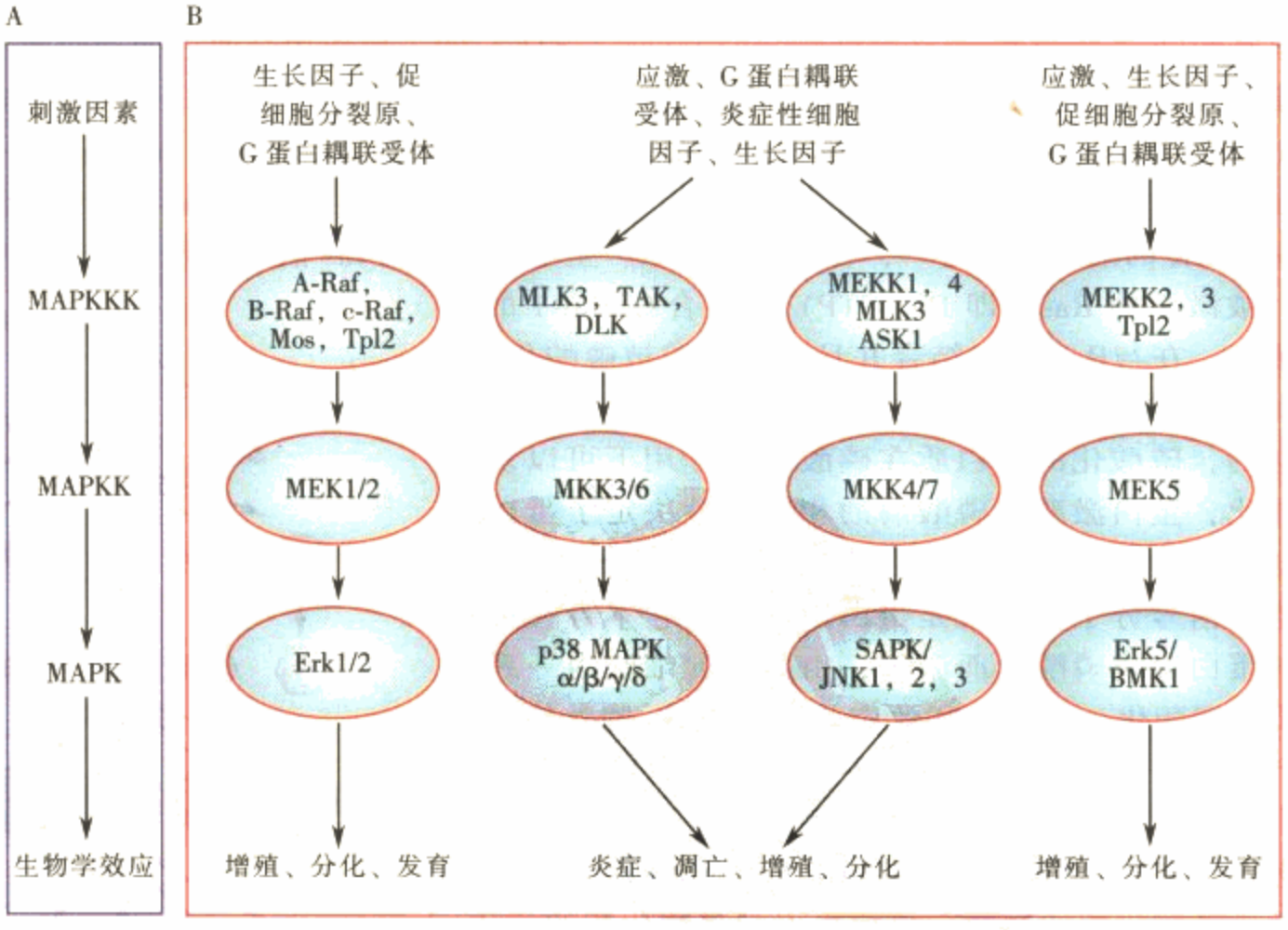
图 12-12　信号转导的级联效应

四、几种细胞信号转导通路

（一）MAPK 信号通路

丝裂原活化蛋白激酶（mitogen activated protein kinase，MAPK）信号通路普遍存在于真核细胞中。MAPK 是一系列激酶酶促级联反应中重要的一环，将多种细胞外刺激信号从细胞膜转导到细胞核内，与其他信号通路协同作用，使细胞对外界环境做出合适的反应，参与细胞生长、增殖、分化以及凋亡等重要生理过程的调控。

细胞外的刺激信号经过适当的中间环节转导后，激活丝裂原活化蛋白激酶的激酶（mitogen activated protein kinase kinase kinase，MAPKKK），再激活丝裂原活化蛋白激酶（mitogen activated protein kinase kinase，MAPKK，MEK），MAPKK 能磷酸化丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）的苏氨酸和酪氨酸双位点使之活化，然后再进一步活化其他下游靶基因。目前的研究将 MAPK 分成四个亚族。前三个亚族为细胞外信号调节激酶（extracellular-signal regulated protein kinase，ERK，又称为 p42/44 MAPK）、p38 丝裂原活化蛋白激酶（p38 MAPK）和 c-Jun 氨基末端激酶（JNK，又称为应激激活的 MAPK）。ERK5 虽然在结构上与典型的 ERK 有同源性，但其上游 MEK 和下游的磷酸化底物存在很大差别，被单独另列为第四个亚族。MAPK 信号通路的主要结构如图 12-13 所示。图 12-13A 所示为 MAPK 信号转导通路的基本模式，图 12-13B 列出了 MAPK 通路的四个主要的分支，在酵母和哺乳动物细胞中这些分支通路通常是各自独立的。并行的 MAPK 通路各有特点，它们与其他多种细胞内信号通路如 PKC、TGF-β 等相互作用。在不同的细胞中，通过不同 MAPK 亚类间信号的整合与协同可产生不同的甚至完全相反的生物学效应，确保细胞反应的精确性和准确性以适应不同的外界环境变化。

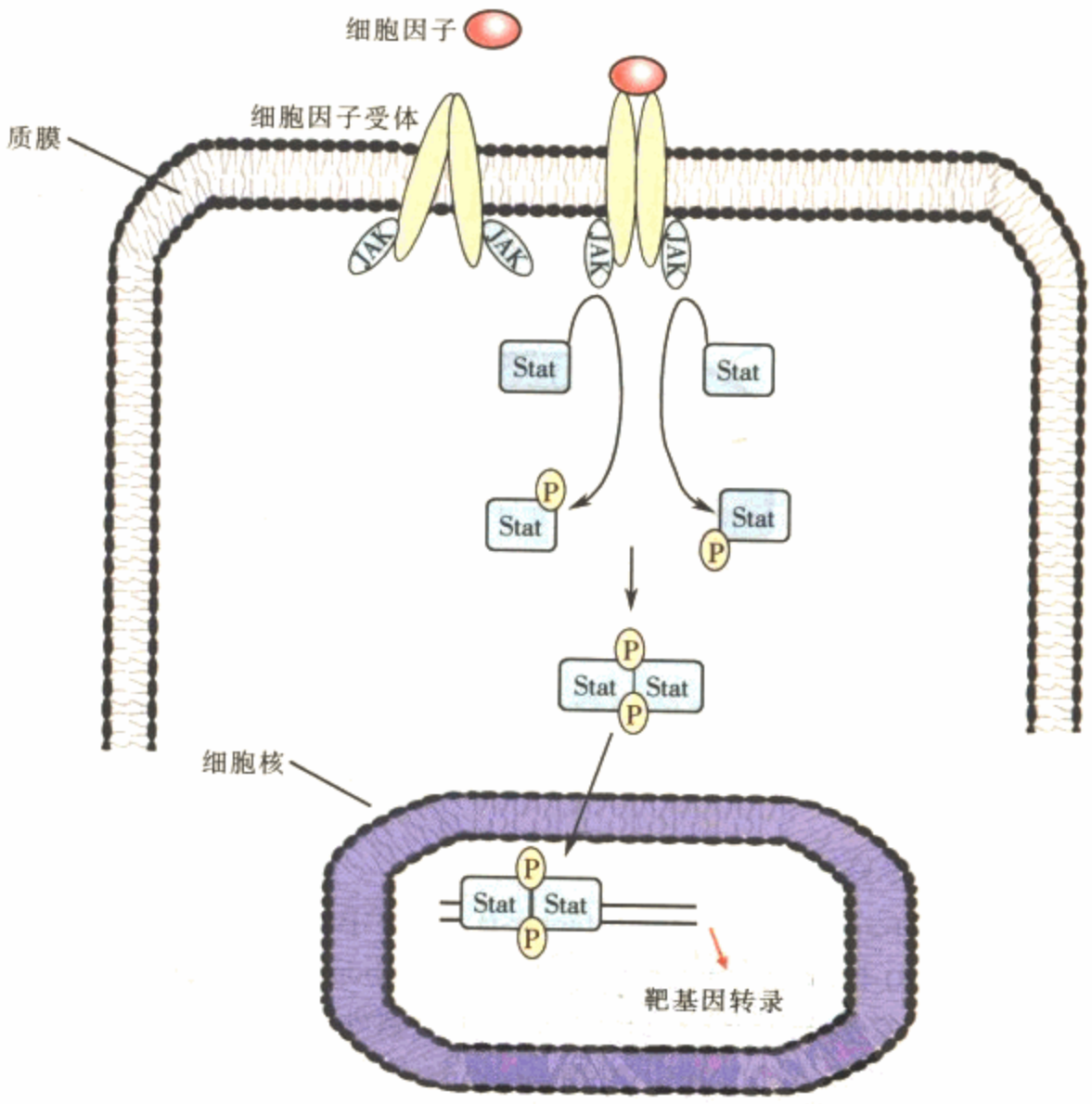


●图 12-13　MAPK 信号转导通路

（二）JAK-STAT 信号通路

JAK 激酶（janus activated kinase）是一类在细胞因子信号传递过程中起重要作用的非受体酪氨酸激酶。JAK 激酶活化后激活其下游信号蛋白分子——信号转导和转录激活因子（signal transducer and activator of transcription，STAT），从而进行胞内信号传递。

迄今发现的 JAK 激酶家族包括：JAK1，JAK2，JAK3 和 Tyk2。STAT 因子家族包括：Stat1，Stat2，Stat3，Stat4，Stat5a，Stat5b 和 Stat6。JAK-STAT 通路的活化依赖于某些细胞因子等配体与其相应受体的结合，引起受体的构象改变，进而激活与受体相关联的 JAK 激酶家族成员。JAK 激酶的活化依次引起特异性的受体酪氨酸残基磷酸化和相应的 STAT 因子磷酸化，从而激活 STAT 因子。激活的 STAT 蛋白从受体上游离并在细胞质中形成二聚体。该复合物进入细胞核内与 GAS（gamma activated site）增强子家族成员相结合，从而诱导靶基因表达（图 12-14）。能够激活 JAK-STAT 信号传导通路的细胞因子为数众多，其中包括在调节细胞分化、增殖和凋亡等生物学过程中起重要作用的干扰素家族、IL-6 类细胞因子等。

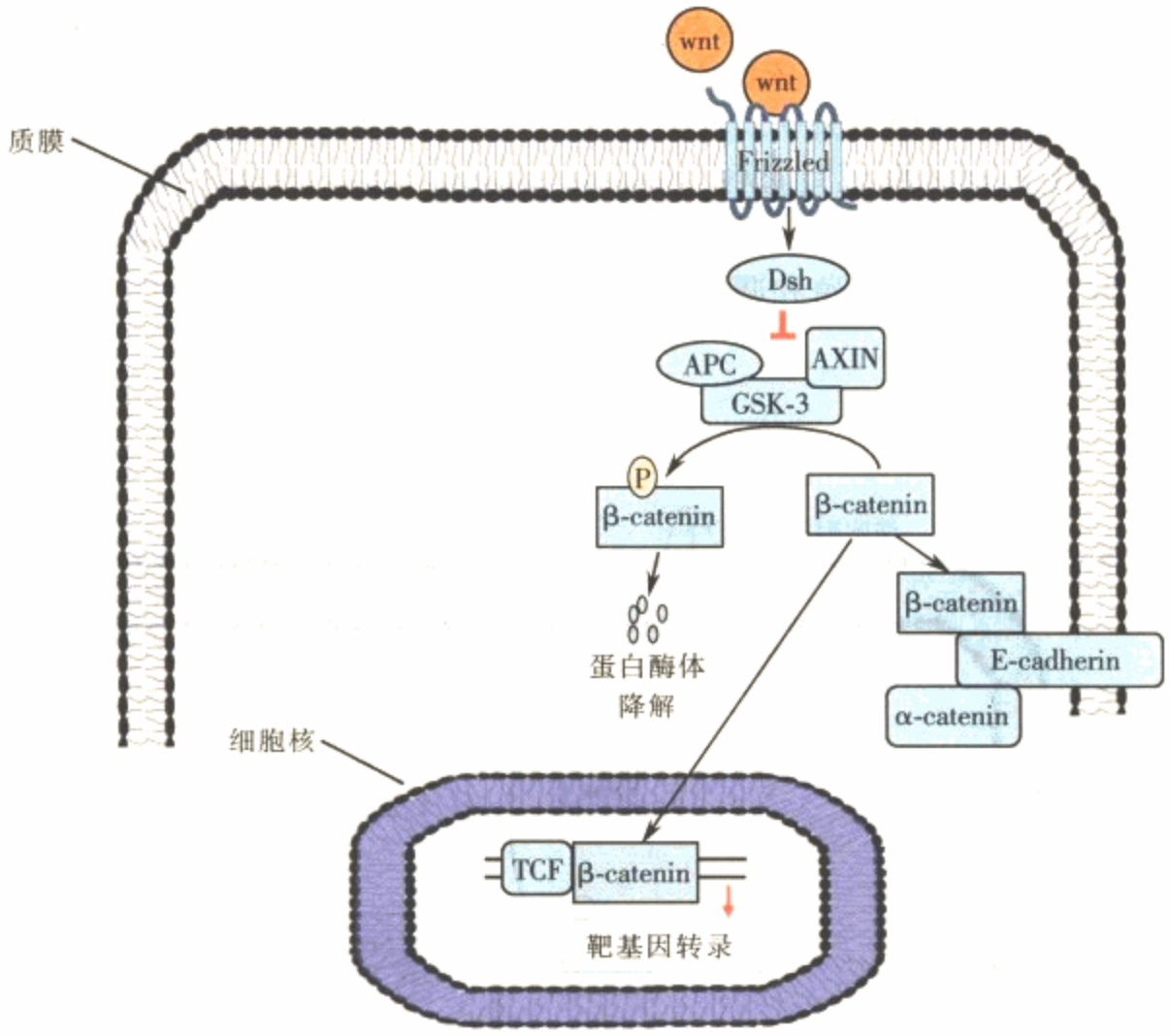


●图 12-14　JAK-STAT 信号通路

（三）Wnt 信号通路

Wnt 蛋白及其受体、调节蛋白等一起组成了复杂的 Wnt 信号通路，调控细胞的增殖、分化，参与包括哺乳动物脑、心血管、肺和生殖器官发育在内的多个发育过程。Wnt 家族分泌蛋白、Frizzled 家族跨膜受体蛋白 Dishevelled（Dsh）、糖原合成酶激酶 3（GSK3）、APC、Axin、β-连环蛋白（β-catenin）及 TCF/LEF 家族转录调节因子等构成了 Wnt 通路的经典途径。

在细胞内，一个由 GSK3、Axin、APC 和 β-catenin 组成的蛋白复合物调控 β-catenin 的活性。在缺乏 Wnt 信号时，β-catenin 被该蛋白复合物磷酸化后被蛋白酶体降解；当 Wnt 信号通过细胞表面 7 次跨膜受体 Frizzled 家族成员激活胞质 Dishevelled（Dsh）蛋白时，可以抑制由 GSK3、Axin、APC 和 β-catenin 组成的蛋白复合物的活性，使 β-catenin 免于磷酸化而不被降解，导致它们在胞质内积聚并易位到核内与转录因子 TCF（T-cell factors）家族成员结合，促进靶基因的表达，产生生物学效应（图 12-15）。

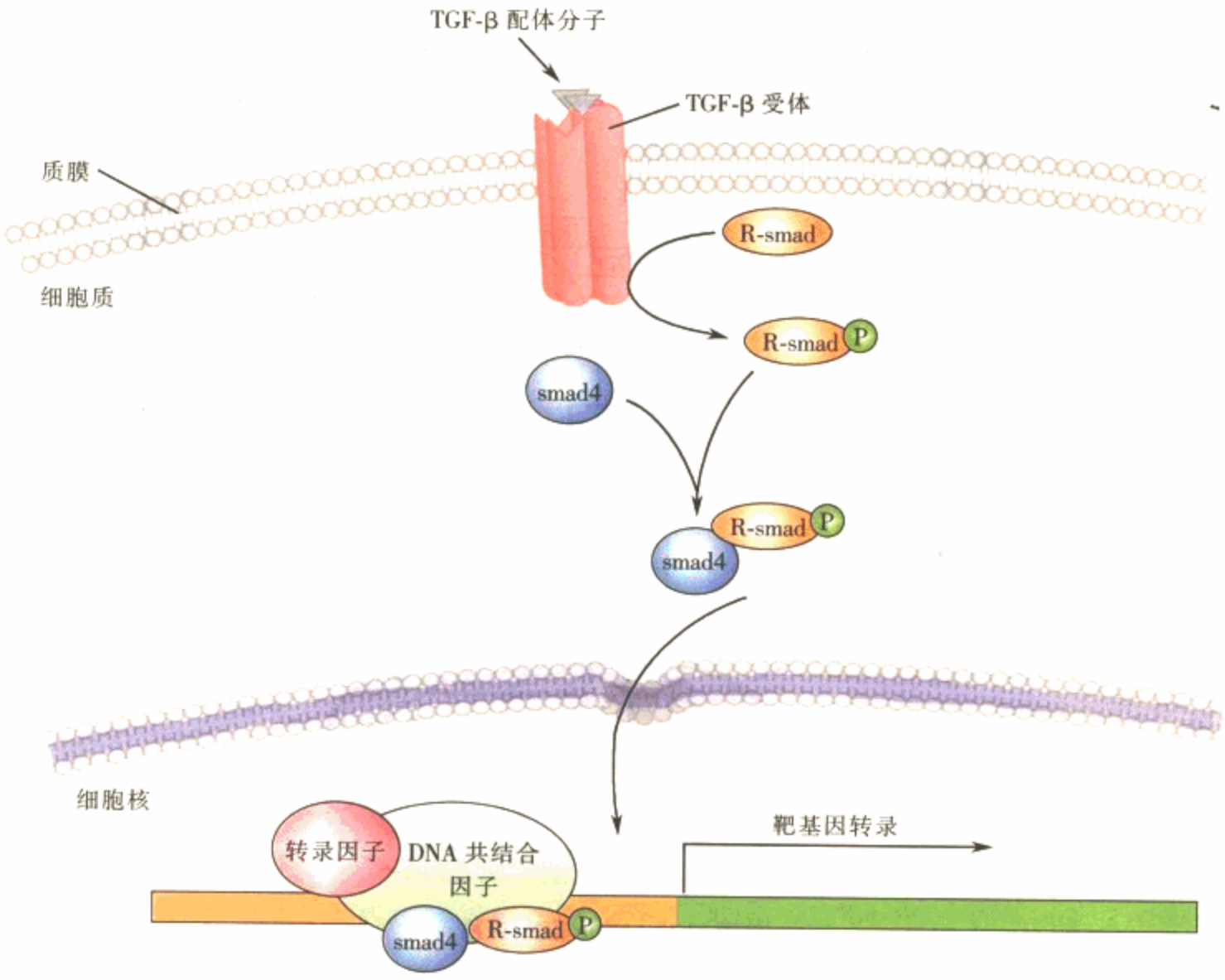


●图 12-15　Wnt 信号转导通路

近年研究表明，Wnt 信号转导通路异常激活也参与多种人类癌症的发病过程，如 β-连环蛋白的致癌性突变，APC 的失活性突变等均可导致 Wnt 途径的异常活化和胃肠道肿瘤发生。

（四）TGF-β 信号转导通路

转化生长因子-β（transforming growth factor-β，TGF-β）是一类在结构上相似的分泌型多肽生长因子，有近 30 种成员，包括 TGF-β、BMP（bone morphogenetic protein）、activin 等多个亚家族。TGF-β 家族分子在合成后被分泌到细胞外，其活性形式大多为二聚体。经典的 TGF-β 信号转导通路（图 12-16）需要 Smad 分子作为细胞内信号分子，将细胞外的 TGF-β 信号转导到细胞核内。根据功能不同，细胞内的 Smad 分子分为三类，即受体激活型 Smad（R-Smad，包括 Smad1/2/3/5/8）、通用型 Smad（Smad4）和抑制型 Smad（Smad6/7）。TGF-β 与细胞表面的受体结合后，活化的受体会进一步磷酸化细胞内的受体激活型 Smad 分子。磷酸化的受体激活型 Smad 分子在细胞质内与通用型 Smad 组成复合体，被转运到细胞核，发挥转录因子的作用，调控下游靶基因的表达水平。Smad 分子由 MH1 和 MH2 两个结构域以及连接它们的铰链区组成，MH1 结构域具有 DNA 结合能力，MH2 结构域可与多种其他转录因子相互作用。由于细胞的生理状态和分化情况不同，在不同的细胞中相同的 TGF-β 信号可以引起截然相反的调节作用。TGF-β 还可以激活包括MAPK 信号通路在



●图 12-16　TGF-β 信号通路

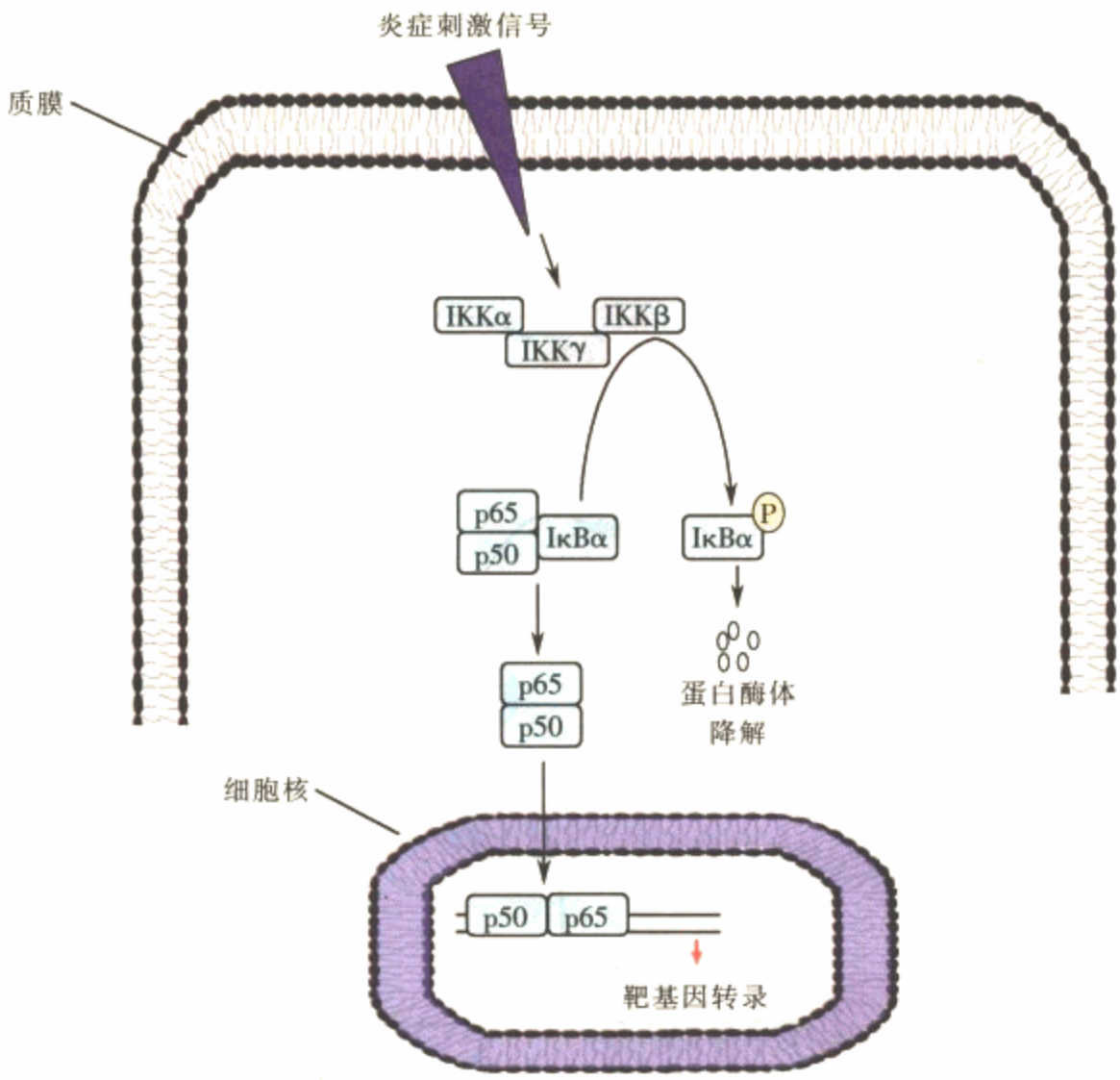
内的其他信号通路，共同调节细胞的生命活动。TGF-β 信号通路在控制细胞生长、增殖、分化以及个体与器官发育过程中起着重要作用。

（五）NF-κB 信号通路

核转录因子 κB（nuclear factor-kappa B，NF-κB）是与免疫球蛋白重链和 κ 轻链基因增强子序列特异结合的核蛋白因子，它通过与多种基因的启动子和增强子序列位点特异性结合，调节基因的转录和表达，参与免疫、炎症、应激等反应，同时也参与调控细胞分化、增殖、凋亡等过程。近年来的研究显示，NF-κB 活性异常与人类肿瘤发生密切相关。

在哺乳动物细胞中迄今发现五种 NF-κB 家族成员：RelA（p65）、RelB、c-Rel、NF-κBl（p50）、NF-κB2（p52）。它们以同源或异源二聚体形式存在，最常见的二聚体是 p50-p65 异二聚体，也就是常说的 NF-κB。细胞在静息状态下，NF-κB 与其抑制因子 IκB（inhibitors of NF-κB）结合组成异源多聚体，以无活性形式存在于细胞浆中；当细胞受到炎症因子等 NF-κB 激活剂刺激时，激活胞浆中 IKKs（IκB kinase），使无活性的 NF-κB 三聚体复合物中的 IκB 的 N 端调节区的 Ser32/36 磷酸化，随后发生泛素化，在蛋白酶体作用下降解，IκB 的解离暴露出 p50 亚基的易位信号和 p65 亚基的 DNA 结合位点，使 p50-p65 异二聚体从细胞浆易位至细胞核内，与 κB 序列结合，发挥转录调控作用（图 12-17）。

应当指出的是，各种信号转导通路并非独立存在，彼此无关。相反，它们在细胞内形成一个十分复杂的网络系统。诸多研究表明，基因的转录可以由多个信号通路调控，对于



●图 12-17　NF-κB 信号通路

Wnt、Stat3 和 NF-κB 信号通路下游的靶基因而言也是如此。譬如，与细胞的增殖和存活密切相关的 cyclin D1，c-Myc，survivin 和 VEGF 等基因的表达除受 Wnt 通路调控外，还是 NF-κB 和 Stat 的靶基因。因此，在不同的信号通路之间存在着功能互动、互补和代偿的现象，一些情况下，它们通过调控某些共同的下游基因表达而相互影响，协同作用。

第五节　信号转导与疾病

信号转导在细胞正常功能与代谢中起着重要作用，但是当其中某一环节发生障碍，尤其是信号分子出现异常时，细胞则不能对外界的刺激做出正确的反应。许多疾病的产生与信号转导异常相关，以下几类较为常见：

一、受体异常与疾病

这是一类因受体的数量或结构和功能异常引起的疾病，根据病因的不同，可分为三类：

1. 遗传性或原发性受体疾病　因受体基因突变，致使受体缺乏或结构异常引起的疾病，如非胰岛素依赖性糖尿病就是一种常见的遗传性受体疾病。因遗传的原因，出现胰岛素受体的数量减少或功能异常，使细胞对胰岛素的敏感性降低，耐受力增强，由胰岛素激发的细胞内信号转导通路不能正常运行，细胞糖代谢出现障碍，最终导致糖尿病。

2. 自身性免疫受体疾病　在某些情况下，机体自身可产生受体的抗体，这些抗体在与受体结合后，封闭了受体的作用，使受体功能发生改变，由此可引起自身性免疫受体疾

病。如在重症肌无力患者的体内，存在抗乙酰胆碱受体的抗体，当其与乙酰胆碱受体结合后，降低了受体与乙酰胆碱的结合能力，同时促使受体发生分解，细胞表面受体的数量明显减少，与该受体相关的信号转导过程不能正常进行，出现相关的病症。

3. 继发性受体疾病　这是一类因机体自身代谢紊乱，引起受体异常后产生的疾病。如肥胖可降低胰岛素受体的功能，引发糖尿病；心功能不全可使心肌细胞的受体数量减少。

二、G 蛋白与疾病

G 蛋白的 α 亚基上含有细菌毒素糖基化修饰位点。细菌毒素能使这些位点糖基化，引起 α 亚基的 GTP 酶活性失活或与受体结合的能力降低，导致某些疾病的产生。由霍乱弧菌所致的腹泻即与 G 蛋白的异常紧密相关，霍乱弧菌在肠道产生的霍乱毒素由 A、B 两个亚基组成，A 亚基具有 ADP 核酸转移酶的活性，当霍乱毒素与肠上皮细胞表面受体结合后，A 亚基穿过胞膜、插入胞内，催化 NAD^+中的 ADP 转移到 Gs 的 α 亚基上，使其在与 GTP 结合后，丧失 GTP 酶活性，不能水解 GTP 为 GDP，使 G 蛋白的 α 亚基与 βγ 复合物保持一个激活状态，致使其靶蛋白 AC 持续的活化，细胞中 cAMP 的合成显著增加，促使 Cl^-与 HCO_3^-不断进入肠腔，细胞内外渗透压失去平衡，水分大量溢到肠腔，引起急性腹泻和脱水，如不采取紧急措施补充失去的水分和电解质，就会导致死亡。

三、蛋白激酶与疾病

在 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞中有许多种类的酪氨酸激酶，它们在传递淋巴细胞特异性信号、调节机体免疫反应中起着重要的作用。这些激酶在组成及数量上的变化，使淋巴细胞功能出现异常，导致免疫不全症的发生。临床上常见的 X 染色体关联的免疫不全症的病因即与 B 淋巴细胞酪氨酸激酶的异常相关。在这种免疫不全症患者的 B 淋巴细胞中含有一种称为 Bruton's 的酪氨酸激酶（Bruton's tyrosine kinase，BTK），因其基因的转录受阻或者其氨基酸被置换，而发生先天性数量减少或组成异常，从而使幼稚的 B 淋巴细胞不能分化成为产生免疫球蛋白的浆细胞而致病。类似的情况也存在于 T 淋巴细胞中，一种非受体型酪氨酸激酶的变异，可造成另一种免疫不全症。蛋白激酶的异常还与肿瘤的发生相关。某些肿瘤促进剂，如佛波酯作用于细胞时，因其分子结构与 DAG 类似但却难于降解，故在细胞内蓄积并取代 DAG 而与 PKC 结合，引起 PKC 长期的和不可逆的激活，从而刺激细胞持续增殖，最终产生肿瘤。

小结

无论是单细胞生物，还是多细胞生物个体的细胞每时每刻都在与周围环境（包括其他细胞）发生着各式各样的联系，进行着丰富多彩的交流和协调，以保持生物体与周围世界以及生物体本身的平衡与统一。所接受来自胞内和胞外的各种信号的传递和整合，在生命中具有重要的作用。细胞之间联系的信号有许多种，由细胞分泌的、能够调节机体功能的化学信号分子，通过与细胞膜上或胞内的受体特异性结合，将信号转换后传给相应的胞内系统，使细胞对外界信号做出适当的反应的过程称为信号转导。细胞内存在多种信号转导方式及途径，而且彼此间可交叉调控，构成复杂的信号网络。

细胞所接受的信号很多，包括物理信号、化学信号和生物学信号，其中最重要的是由细胞分泌的、能够调节机体功能的一大类生物活性物质，它们是细胞间通讯的信号，被称

为第一信使。它们携带着某些信息，与位于胞膜上或胞浆内特定的受体结合后，受体可将接收到的信息转导给细胞浆或细胞核中的功能反应体系，从而启动细胞产生效应。与受体结合后能使细胞产生效应的物质为激动剂；与受体结合后不产生细胞效应，但可阻碍激动剂对细胞作用的分子为拮抗剂。

存在于胞膜或胞内的能特异性识别并结合胞外信号分子，进而激活胞内一系列生物化学反应，使细胞对外界刺激产生相应效应的一类特殊蛋白质，称为受体。与受体结合的生物活性物质统称为配体。受体在信号转导系统中的作用非常关键，它通过识别和结合配体，触发整个信号转导过程。

受体分为膜受体和胞内受体。膜受体由三部分构成，包括与配体相互作用的细胞外域、将受体固定在细胞膜上的跨膜域和起传递信号作用的胞内域；其配体是一些亲水的、不能直接穿越细胞膜脂质双分子层的肽类激素、生长因子和递质等；又分为离子通道型受体、G 蛋白耦联受体和具有酶活性的受体三种类型。胞内受体为 DNA 结合蛋白，其配体为脂溶性小分子甾体类激素，这些分子可直接以简单扩散的方式或借助于某些载体蛋白跨越靶细胞膜，与位于胞质或胞核内的胞内受体结合，作为转录因子与 DNA 顺式作用元件结合，调节基因的表达。

受体能特异性识别和结合相应的配体，使其相互作用的信号向其他信号分子传导，产生细胞生物学效应。受体与配体的结合具有选择性地与特定配体结合、极强的亲和力、饱和性、可逆性和磷酸化和去磷酸化调节等几个特点。

受体被激活后在细胞内产生的、能介导信号转导的活性物质，称为细胞内信使，又称第二信使。已知的细胞内信使有许多种，其中最重要的有：cAMP、cGMP、二酯酰甘油、三磷酸肌醇和钙离子等。

细胞内信号转导过程是由前后相连的生物化学反应组成的，即前一个反应的产物可作为下一个反应的底物或者发动者，通过一系列蛋白质与蛋白质的相互作用，信息可从胞内一个信号分子传递到另一个信号分子，每一个信号分子都能够激起下一个信号分子的产生，直至产生代谢酶被激活、基因表达被启动和细胞骨架产生变化等细胞生理效应。

信号转导过程具有信号转导分子激活机制的类同性、过程的级联式反应、途径的通用性与特异性和转导途径的相互交叉等特点。

蛋白酪氨酸激酶为可催化底物蛋白酪氨酸残基磷酸化的激酶，是蛋白激酶家族中最重要的成员之一，对细胞生长、增殖和分化等过程起重要的调节作用，包括位于细胞膜上的受体型 PTK 和位于胞质中非受体型 PTK 两大类。

丝氨酸/苏氨酸激酶的主要作用是通过变构而激活蛋白质，催化底物蛋白丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化，包括 PKA、PKC、PKG、钙调蛋白依赖性蛋白激酶和丝裂原激活蛋白激酶。

当信号转导某一环节发生障碍，尤其是信号分子出现异常，细胞则不能对外界的刺激做出正确的反应，将会产生许多与信号转导异常相关的疾病。表现有受体异常性疾病（如遗传性或原发性受体疾病、自身性免疫受体疾病和继发性受体疾病）、G 蛋白和蛋白激酶功能障碍性疾病。

（刘　佳）

第四篇　细胞的基本生命活动

第十三章　细胞分裂与细胞周期

细胞分裂（cell division）为细胞生命活动的重要特征之一，是一个亲代细胞形成两个子代细胞的过程。通过细胞分裂，亲代细胞的遗传物质和某些细胞组分可以相对均等地分配到两个子代细胞中，这有效地保证了生物遗传的稳定性。细胞分裂与新个体的发生，以及与个体器官组织的维持和更新密切相关。在单细胞生物（如细菌、酵母等）中，细胞分裂是其个体繁衍的重要方式，在高等生物中，经过多次细胞分裂生成成熟的性细胞，这些性细胞之间的有性生殖导致受精卵产生，新的生命个体由此出现。细胞分裂构成了多细胞生物个体生长的基础，从受精开始到个体成熟的整个发育进程中，细胞需经历多次分裂，最终形成机体的器官和组织中数量庞大的细胞群体，如仅成人肝脏就含有 2.5×10^{10} 个细胞。细胞分裂在维持和更新个体正常组织中也具有重要的作用，在成体动物的皮肤、骨髓、肠上皮等器官组织中存在一些具有潜在分裂能力的原始细胞，如表皮基底层和毛囊中的干细胞、骨髓造血干细胞和肠上皮干细胞等，通过这些细胞的分裂可以适时地生成大量的新的分化成熟的细胞，以替代因生理性衰老而死亡的细胞，这样，即使组织器官的细胞组成得到自我更新，也使细胞的数量保持恒定，维持了器官组织的正常功能。此外，在机体创伤后的组织修复和再生等活动中都存在大量的细胞分裂现象。

细胞分裂的过程总是呈周期性进行：亲代细胞分裂产生子代细胞；子代细胞经历一系列规律的细胞内生物化学变化，包括遗传物质的复制和特定蛋白质的合成等准备过程，并伴有细胞形态学的改变；然后子代细胞的分裂过程开始。通常将细胞从上次分裂结束到下次分裂结束所经历的规律性变化称为一个细胞周期（cell cycle）。

大多数细胞的周期都包括数个协调的过程：细胞生长、DNA 复制、倍增的染色体分配到子细胞中以及细胞分裂。在细菌，细胞生长和 DNA 复制发生在细胞周期的多数时间内，倍增的 DNA 和质膜一起分配到子细胞中。在真核细胞，细胞周期比较复杂，包含四个分离的时相。虽然细胞生长通常是一个连续的过程，但 DNA 合成仅仅发生在细胞周期的一个时相中，然后，复制的染色体通过一个连续的过程在细胞分裂前被分配到子细胞核中。细胞周期的各步骤进程的调控机制在进化中是保守的，该调控机制不仅可以精细地协调细胞周期中不同的事件，而且还可将调控细胞增殖的细胞外信号与细胞周期联系起来，使整个细胞周期呈现出高度的时空有序性和协同性。

第一节　细 胞 分 裂

细胞分裂的方式主要包括有丝分裂、减数分裂及无丝分裂三种，不同分裂方式在分裂

过程和子代细胞的遗传特性等方面各具其特点。

一、无丝分裂

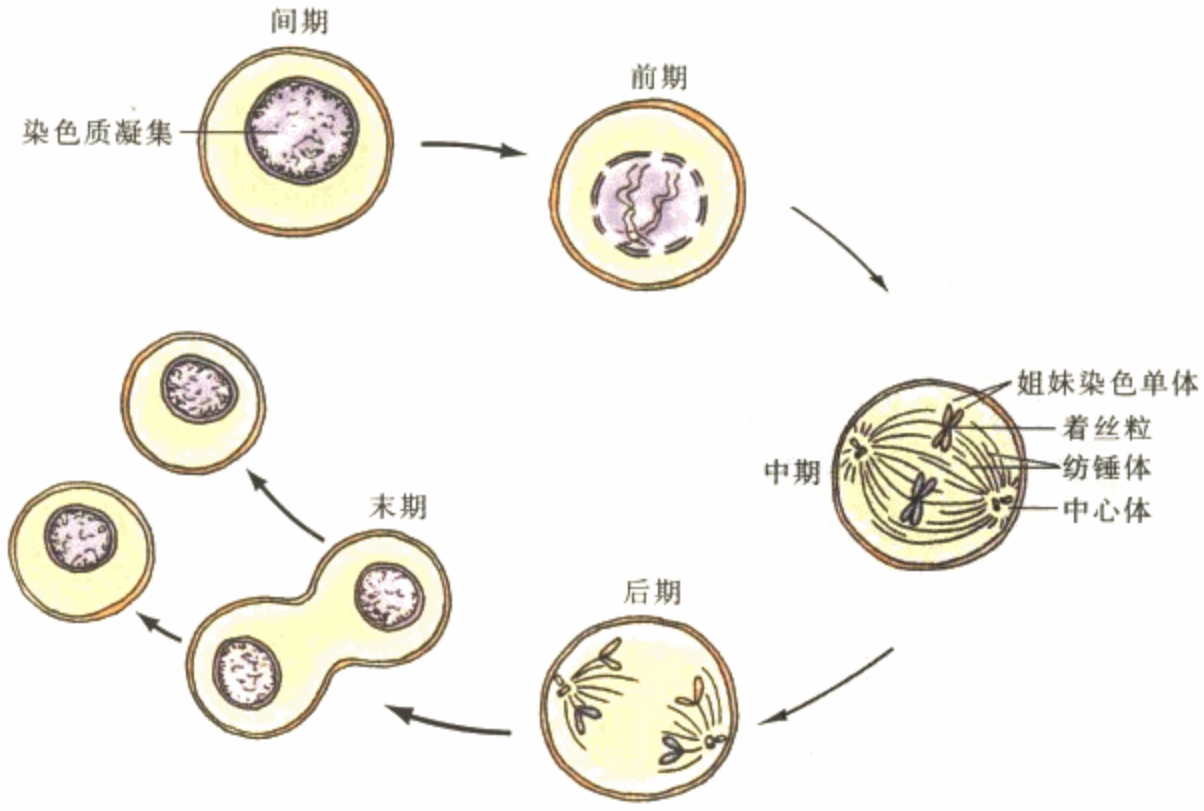
无丝分裂（amitosis）由亲代细胞直接断裂形成子代细胞，因此又称为直接分裂（direct division），是最早被发现的一种细胞分裂方式。细胞无丝分裂前也出现细胞和细胞核的体积增大以及核内 DNA 复制，但进入分裂期后，细胞的核膜不消失，也无纺锤丝形成及染色体组装，由亲代细胞直接断裂形成子代细胞：首先，胞核拉长，高尔基体位移至中心体附近，然后，胞核进一步拉长并从中间断裂，胞质继之也被一分为二，至此，两个子代细胞形成。显然，在无丝分裂中，两个子代细胞所获得的遗传物质和其他胞质成分并不一定是均等的，无丝分裂的细胞维持其遗传的稳定性的机制目前仍不清楚。

无丝分裂在低等生物中较为常见，为其主要的增殖方式。考虑到这种分裂快速、能耗少，分裂进程中的细胞仍可行使功能，因此无丝分裂对于低等生物细胞适应外界环境变化有特殊的意义。现在已经认识到，除了在高等生物的创伤、癌变及衰老的细胞中可观察到无丝分裂外，此分裂方式也存在于它们的多种正常组织中，例如，动物的上皮组织、疏松结缔组织、肌组织及肝脏等的细胞均可进行无丝分裂。研究还表明，无丝分裂与有丝分裂间能够相互转化。

二、有丝分裂

有丝分裂（mitosis）也称间接分裂（indirect division），是高等真核生物细胞分裂的主要方式。有丝分裂的过程中，当细胞核发生一系列复杂的变化（DNA 复制、染色体组装等）以后，细胞通过形成有丝分裂器，将遗传物质平均地分配到两个子代细胞中，有利于细胞在遗传上的稳定。

有丝分裂是一个连续的动态变化过程，持续时间约 0.5~2 小时，根据分裂细胞的形态和结构的变化，有丝分裂可被分为前期、中期、后期及末期（图 13-1）。



●图 13-1　细胞有丝分裂

（一）分裂前期核内染色质开始凝集

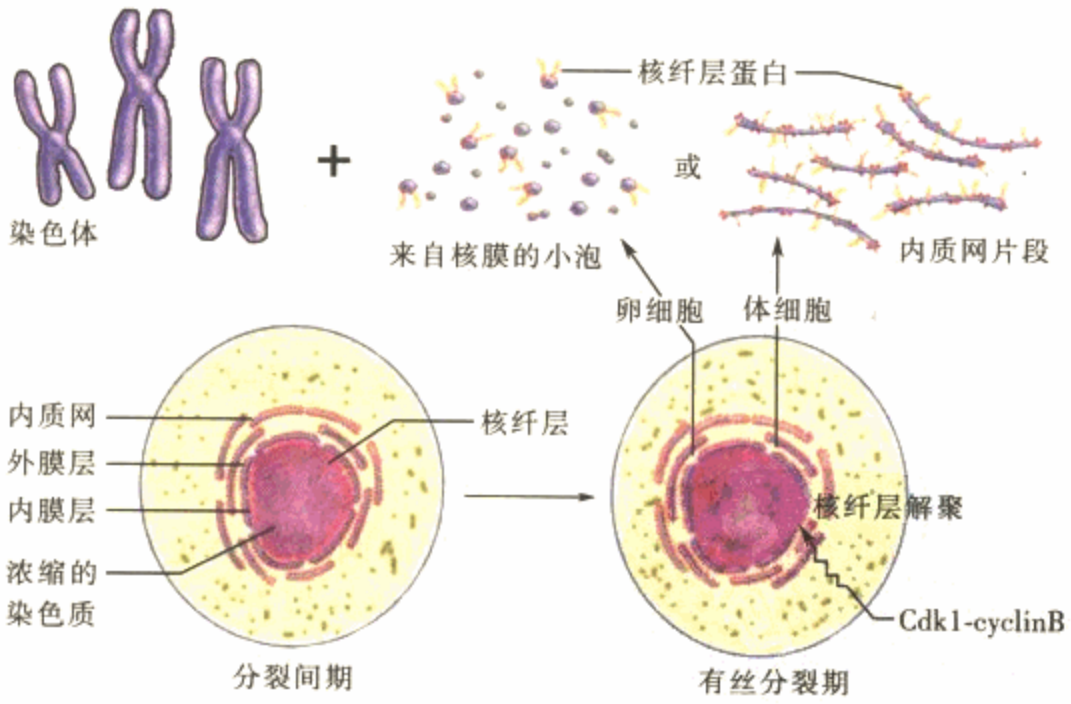
前期（prophase）细胞变化的主要特征包括：染色质凝集、分裂极确定、核仁缩小解体以及纺锤体形成。

前期以核内松散的染色质纤维螺旋化并发生折叠为起始标志。在此期中，线状的染色质纤维逐渐凝集成棒状或杆状的染色体，每条染色体包含两条由着丝粒连接的染色单体，着丝粒两侧附着的是多种蛋白质组成并在电镜下呈板状或杯状复合结构，即动粒。染色质凝集过程中，与核小体组装相关的组蛋白也发生磷酸化，由此可进一步促进染色质的凝集。

随着染色质的凝集，原来分布于细胞同一侧并已经完成复制的两个中心体(centrosome)开始沿核膜外围分别向细胞的两极移动，它们最后到达的位置将决定细胞分裂极。中心体是与染色体分离相关的细胞器，每一中心体由一对中心粒（centriole）及周围无定型基质所构成，这些无定型基质中包含多种与中心体结构和功能相关的蛋白质成分，如微管蛋白、微管结合蛋白、马达蛋白以及一些与细胞周期调控有关的蛋白质。中心体是细胞的微管组织中心之一，其周围放射状分布着大量微管，这些微管与中心体一起被合称为星体(aster)。中心体中的马达蛋白以星体微管作为轨道，利用 ATP 水解提供的能量沿微管移动，由此牵引两个子中心体彼此分离，移向细胞的两极。

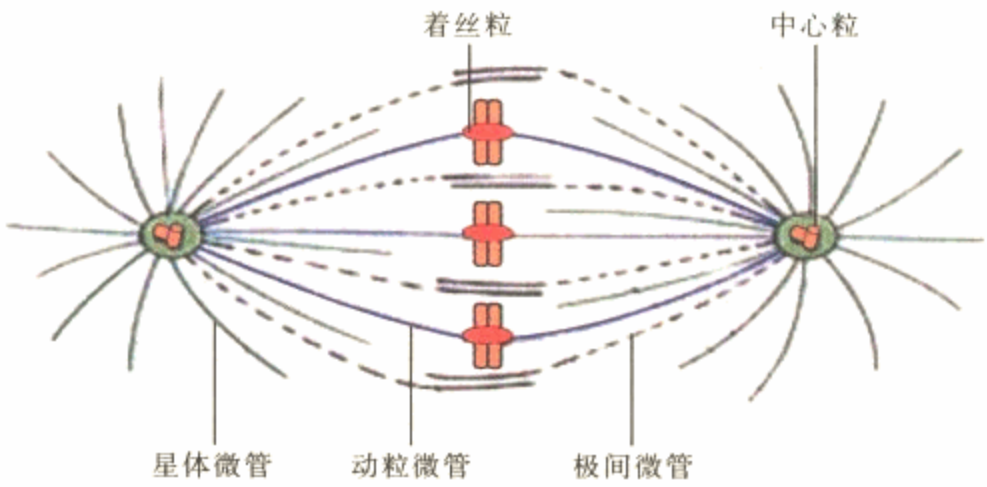
在染色质凝集过程中，因染色质上的核仁组织中心组装到了所属染色体中，导致 rRNA 合成停止，核仁开始逐渐分解，并最终消失。

前期中发生的细胞内事件还包括核膜破裂、纺锤体形成及染色体向赤道面运动。在前期末，因核纤层蛋白多肽链的多个位点发生磷酸化，致使核纤层降解，随之核膜破裂，形成许多断片及小泡，分散于胞质中。核膜破裂形成的这些小泡与内质网膜泡形态相似，在核膜重建时，成为新核膜的组分。近年来还发现在某些动物的体细胞中，核膜解聚后可直接为内质网所吸收，参与到由内质网断片所组成的网络中（图 13-2）。



●图 13-2　前期核膜的变化

纺锤体（spindle）是一种出现于前期末，对细胞分裂及染色体分离有重要作用的临时性细胞器，由星体微管、动粒微管（kinetochore microtubule）和重叠微管纵向排列构成，呈纺锤样外观（图 13-3）。星体微管排列于中心体周围，在中心体向细胞两极的移动中起作用。动粒微管由纺锤体的一极发出，末端附着于染色体动粒上。重叠微管为一些来自纺锤体两极，彼此在纺锤体赤道面重叠、交叉的微管。重叠微管之间在侧面相连，从而可从



●图 13-3　纺锤体结构示意图

纺锤体的一极通向另一极，故又被称为极间微管（polar microtubule）。三类纺锤体微管的负端均朝向中心体，正端则远离中心体。在纺锤体的形成过程中，星体微管起着更重要的主导作用，星体微管逐渐向细胞中心原细胞核所在部位侵入，连接到染色体动粒上或彼此重叠，构成其他类型的纺锤体微管。

在细胞进入前期末时，染色体凝集程度增高，变得更粗、更短，与同一条染色体相连的两动粒微管长短不等，纺锤体赤道面直径较宽，两极距离相对较短，染色体在细胞中分布无规律。随着动粒微管正端不断聚合与解聚的牵引作用，染色体发生剧烈地震荡和摇摆运动，逐渐移向细胞中央的赤道面，此即染色体列队（chromosome alignment）。

（二）分裂中期的细胞赤道面上排列着高度凝聚的染色体

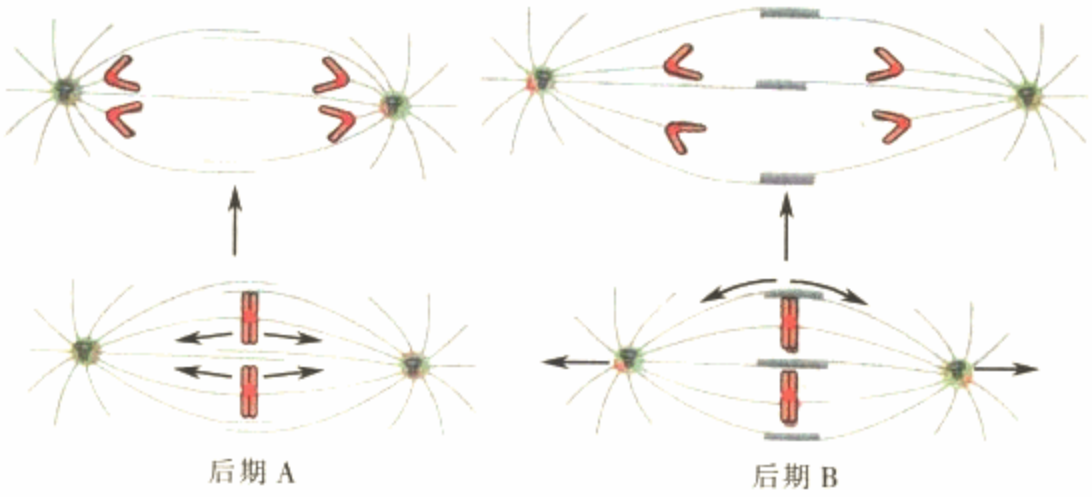
中期（metaphase）的主要特点是染色体达到最大程度的凝集，并且非随机地排列在细胞中央的赤道面上。在人类细胞中，最大的几条染色体靠近赤道面中部，较小染色体则位于其周围。

在中期，所有染色体的着丝粒均位于同一平面，染色体两侧的动粒均面朝纺锤体两极，每个动粒上结合的微管可达数十根，两个动粒上的微管长度相等，纺锤体赤道面直径变小，两极距离增长，处于动力平衡状态中。

在中期细胞中，由染色体、星体、中心粒及纺锤体所组成的结构被称为有丝分裂器（mitotic apparatus），中期以后发生的染色体分离、染色体向两极的移动及平均分配到子代细胞等活动中，有丝分裂器发挥了关键性的作用。此外，因为此期染色体在形态上比其他任何时期都短粗，同时两条姐妹染色单体的臂较易分离，故特别适合于进行染色体数目、结构等细胞遗传学的研究，对于临床上肿瘤及遗传性疾病的分析诊断也有一定的价值。

（三）分裂后期完成姐妹染色单体分离

后期（anaphase）细胞变化的主要特征是染色体两姐妹染色单体分离并移向细胞的两极。姐妹染色单体分离的原因主要与染色体着丝粒分裂有关，动粒微管张力的影响并不大，因为已证实在使用秋水仙素破坏微管形成后，两条单体仍可分离。分离染色单体的向极运动需依靠纺锤体微管的牵引完成。当动粒微管端微管蛋白发生去组装时，其长度将不断地缩短，借此可带动染色体的动粒向两极移动。在后期的前段时间中（后期A），染色体两臂的移动常落后于动粒，因此在形态上可呈现V、J或棒形。稍后（后期B），染色体的向极运动则与两极间的距离增加和纺锤体拉长有关。重叠微管长度的增长及彼此间的滑动，星体微管向外的作用力均能使纺锤体两极分开（图13-4）。分离染色单体的向极运动还与马达蛋白的作用有关，该蛋白能协调纺锤体微管，将染色体向两极牵引。

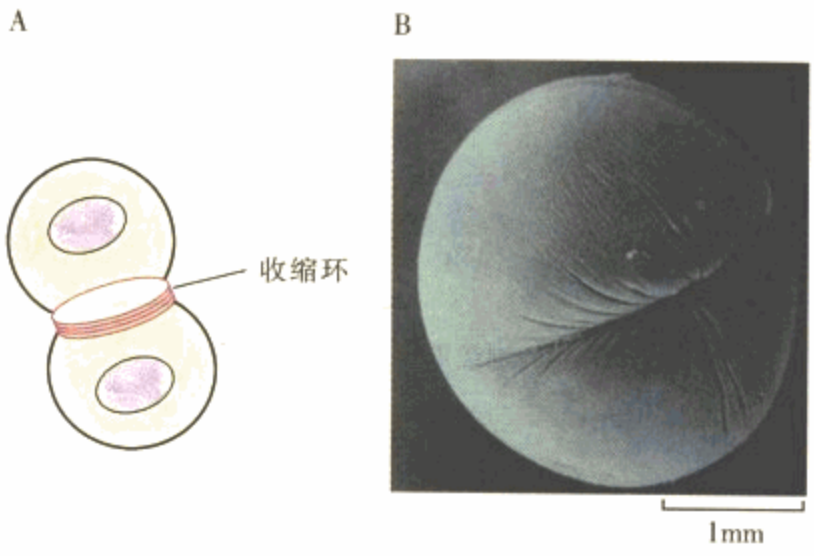


●图 13-4　有丝分裂的后期

（四）分裂末期的细胞核重新组装并完成核分裂

末期（telophase）细胞主要的特点是子代细胞的核形成与胞质分裂。随着后期末染色体移动到两极，染色体被平均分配的完成，发生了和分裂前期相反的染色体解聚的过程。此时染色体上的组蛋白 H_1 发生去磷酸化，高度凝聚的染色体开始解旋，细长的染色质纤维重新出现，RNA 合成恢复，核仁重新形成。同时，分散在胞质中的核膜小泡向染色体表面集聚，并相互融合，在每条染色体的周围形成双层核膜；核孔在核膜上重新组装，去磷酸化的核纤层蛋白重新结合形成核纤层，并连接于核膜上，至此，两个子代细胞的核形成，核分裂完成。

当细胞分裂进入后期末或末期初，在中部质膜的下方，出现了由大量肌动蛋白和肌球蛋白聚集形成的环状结构，即收缩环（contractile ring）（图 13-5）。此时胞质中的纺锤体也逐渐解体，残存的微管及一些囊泡也聚集于子代细胞核之间的细胞中部，所形成的环型致密层称为中体。由收缩环中肌动蛋白、肌球蛋白装配而成的微丝束，通过相互滑动使收缩环不断缢缩，直径减小，与其相连的细胞膜逐渐内陷，形成分裂沟。在分裂沟不断加深的过程中，细胞形状随之变为椭圆形、哑铃形，当分裂沟深至中体时，细胞在此发生断裂，胞质分裂完成。胞质分裂过程所需要的能量由 ATP 提供。应该指出，胞质分裂和核分裂并不一定同步进行，此外，一些多核细胞（如破骨细胞、骨骼肌细胞和肝细胞）只发生核分裂而无胞质分裂。现已知道，分裂沟发生的时间及部位与纺锤体的位置密切相关，纺锤体的位置决定着两个子代细胞的大小，当纺锤体处于细胞中央时，细胞对称分裂，产生的两个子代细胞大小均等，成分相同。相反，不在细胞中央的纺锤体将导致细胞不均等分裂，所产生的子代细胞在大小、成分上均有差异。



●图 13-5　收缩环

A. 肌动蛋白和肌球蛋白纤维形成收缩环，引起胞质分裂，生成两个子细胞　B. 扫描电镜显示分裂中的蛙卵细胞

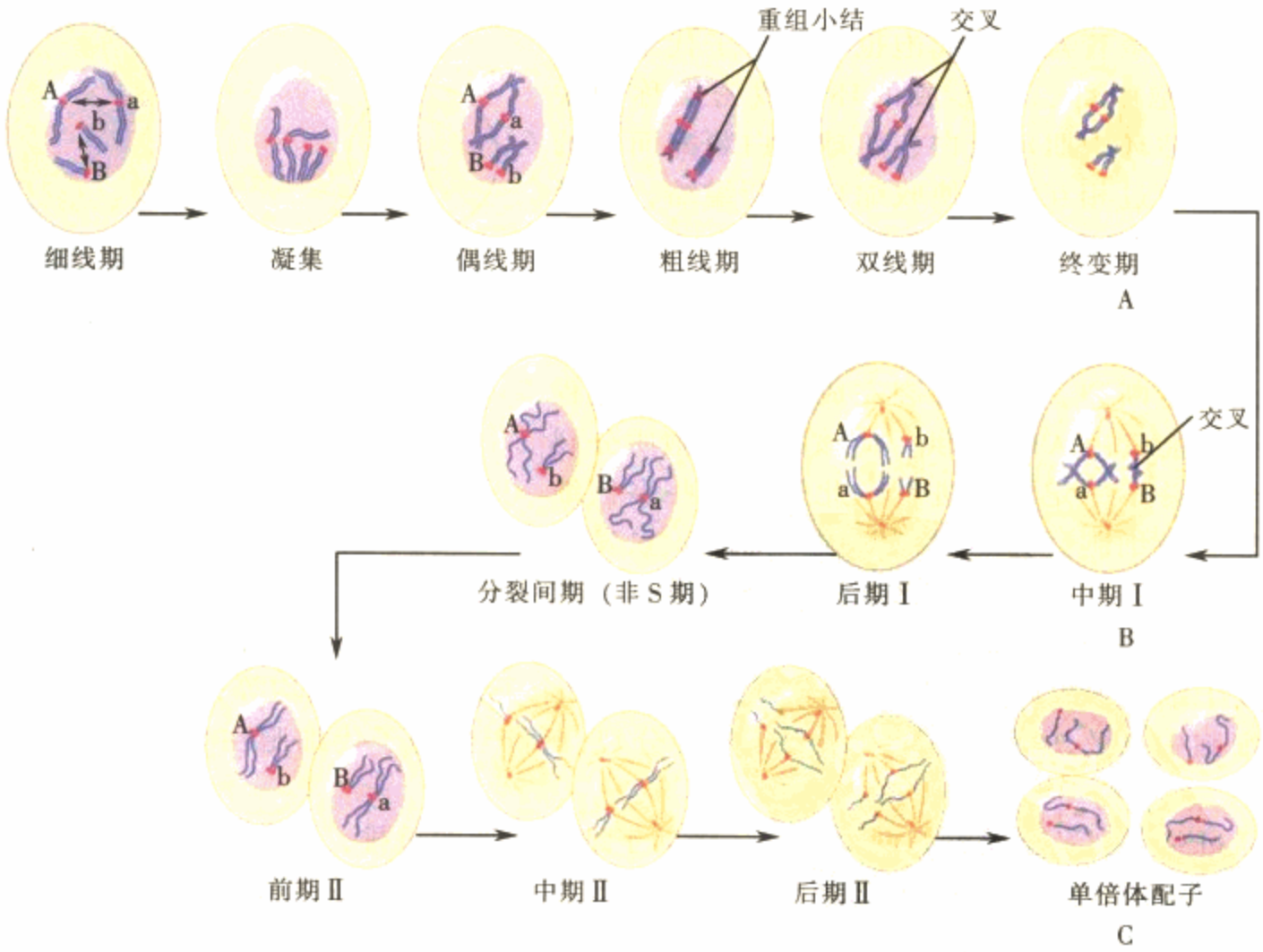
通过核分裂及胞质分裂两个过程，借助于细胞骨架的重排，有丝分裂的细胞实现了染色体及胞质在子代细胞中的均等分配。染色质凝集、纺锤体及收缩环的形成是有丝分裂活动中的三个重要的特征，也是生物长期进化产生的结果。蛋白质磷酸化与去磷酸化是有丝分裂中染色质凝集与去凝集、核膜解聚与重建等变化产生的分子基础，有丝分裂时细胞间及细胞与胞外基质间黏附性减弱、连接松弛，也与蛋白质磷酸化状态相关。

有丝分裂是真核生物所具有的一种古老的生命活动。伴随着生物的长期进化，有丝分裂方式呈现出多种变异。许多单细胞生物，如酵母、粘菌等，在其细胞分裂整个过程中，细胞核膜均保持完整，纺锤体形成及染色体分离均发生于核膜内，纺锤体两极附着在核膜上，这类分裂方式被称为封闭式有丝分裂（closed mitosis），而在大多数植物和动物中，细胞进行的是一种开放式有丝分裂（open mitosis），即伴随着细胞的分裂，核膜进行有规律的崩解及重组。纺锤体装配的同时，发生着核膜的破裂；在细胞质中，姐妹染色单体经纺锤体微管牵引移向两极，此时细胞中已无核膜存在。

三、减数分裂

减数分裂（meiosis）发生于有性生殖细胞的成熟过程中，主要特征是 DNA 只复制一次，而细胞连续分裂两次，因此子代细胞中染色体数目比亲代细胞减少一半，成为仅具单倍体遗传物质的配子细胞。减数分裂对于维持生物世代间遗传的稳定性有重要的意义，经过减数分裂，有性生殖生物配子中的染色体数目由 2n 变为 n。受精后，配子融合形成的受精卵中染色体数又恢复为 2n，由此保证了有性生殖的生物上下代在染色体数目上的恒定。减数分裂也构成了生物变异及多样性的基础：减数分裂过程中可发生遗传物质的交换、重组及自由组合，使生殖细胞呈现出遗传上的多样性，生物后代变异增大，对环境的适应力增强。

减数分裂的两次分裂分别称为第一次减数分裂（meiosis Ⅰ）及第二次减数分裂（meiosis Ⅱ）。第一次减数分裂是同源染色体通过联会进行片段交换，随后分开，完成染色体数目减半及遗传物质的交换；第二次减数分裂与有丝分裂相似，是染色单体分开。两次分裂之间，通常有一个短暂的间隔期。经过两次分裂形成 4 个单倍体细胞（图 13-6）。



●图 13-6　减数分裂图解

A. 减数分裂前期　B. 减数分裂 Ⅰ　C. 减数分裂 Ⅱ

（一）第一次减数分裂进程中细胞内发生复杂的生化和形态变化

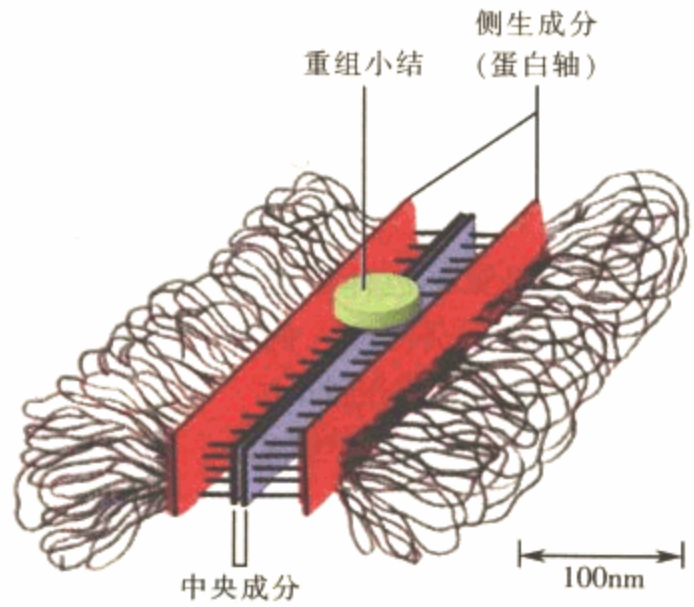
第一次减数分裂可进一步分为前期Ⅰ、中期Ⅰ、后期Ⅰ和末期Ⅰ。

1. 前期Ⅰ　此期持续时间在物种间差异很大，从数周到数十年不等，同时细胞变化复杂，出现胞核显著增大，染色质凝集以及染色体配对和片段交换等。根据细胞形态变化的特点可将前期Ⅰ再细分为以下五个不同阶段：

（1）细线期：细线期（leptotene stage）也称为染色质凝集期。在间期已经完成复制的染色质开始凝集和同源染色体配对是本期的特点。虽然进行配对的每一染色体均具有两条染色单体，但在光镜下仍呈单条细线状，染色单体的臂未完全分离，这可能因为染色体上某些 DNA 片段的复制尚未完成。细线状染色体通过其端粒附着于核膜上，在局部出现成串的、大小不一的珠状结构，称为染色粒。此期细胞中，核及核仁的体积均增大，推测与 RNA 和蛋白质合成有关。

（2）偶线期：偶线期（zygotene stage）的特点是同源染色体配对。染色质进一步凝集，分别来自父母的、形态及大小相同的同源染色体（homologous chromosomes）相互靠近、配对，称为联会（synapsis）。染色体配对从同源染色体上的若干不同部位的接触点开始，沿其长轴迅速扩展到整个染色体。同源染色体完全配对后形成的复合结构即为二价体（bivalent），因其共有四条染色单体，又被称为四分体（tetrad）。同源染色体的相互识别是配对的前提，但机制还不清楚，可能与染色体端粒对核膜的附着有关。每条同源染色体通过端粒与核膜相连，联会开始时，首先是两条同源染色体端粒与核膜的接触点彼此逐渐靠近、结合，其后是结合位点向染色体其他部位延伸。

在联会的同源染色体之间，沿纵轴方向形成了一种特殊的结构，称联会复合体（synaptonemal complex，SC），在电镜下它包括三个平行的部分：侧生成分（lateral element）宽约 20~40nm，位于复合体两侧，电子密度较高，其外侧为同源染色体 DNA。两侧生成分之间电子密度较低的区域为中间区，宽约 100nm，其中央为电子密集的中央成分（central element）。侧生成分与中央成分之间由横向排列的、被称为 L-C 纤维的细丝相连（图 13-7）。



●图 13-7　联会复合体的结构

联会复合体的成分主要为蛋白质，还包括 DNA、RNA 等。侧生成分主要由蛋白质组成，包括 DNA 拓扑酶、组蛋白以及其他一些已被鉴定的蛋白，这些蛋白质分子量大小不一，功能不清。侧生成分中也含有 DNA，存在于侧生成分与染色体接触部位，或者沿侧生成分形成一些线状轴丝。中央成分及 L-C 纤维主要由非组蛋白形成。

联会复合体是同源染色体配对过程中细胞临时生成的特殊结构，其装配最早发生于细线期，在偶线期完成。在细线期同源染色体尚未配对之前，联会复合体的单体从胞质进入胞核，与染色体结合后，在两姐妹染色单体之间聚合成一条侧生成分的轴心，沿染色体全长分布。偶线期初期，随着同源染色体彼此靠近，相应的两条侧生成分的轴心各自向其垂直方向产生 L-C 纤维细丝，构成了联会复合体中间区，两同源染色体由此被连接起来。L-C 纤维细丝在中央重叠、锁合，形成中央成分。联会复合体的形成使两同源染色体之间的连接变得更为牢固。此外，联会复合体的形成中还可能有 DNA 的参与，偶线期细胞中存在 0.3%的 DNA 合成，称为 Z-DNA，如抑制其合成，联会复合体的组装将受到阻止。

联会复合体的形成对于稳定二价体中同源染色体紧密的配对有重要意义。在联会起始阶段，当染色质凝集程度较低时，同源染色体之间主要通过其特定位点上碱基间的互补进行接触。当联会复合体随着染色质进一步的凝集逐渐形成，其组成中加入了某些单链

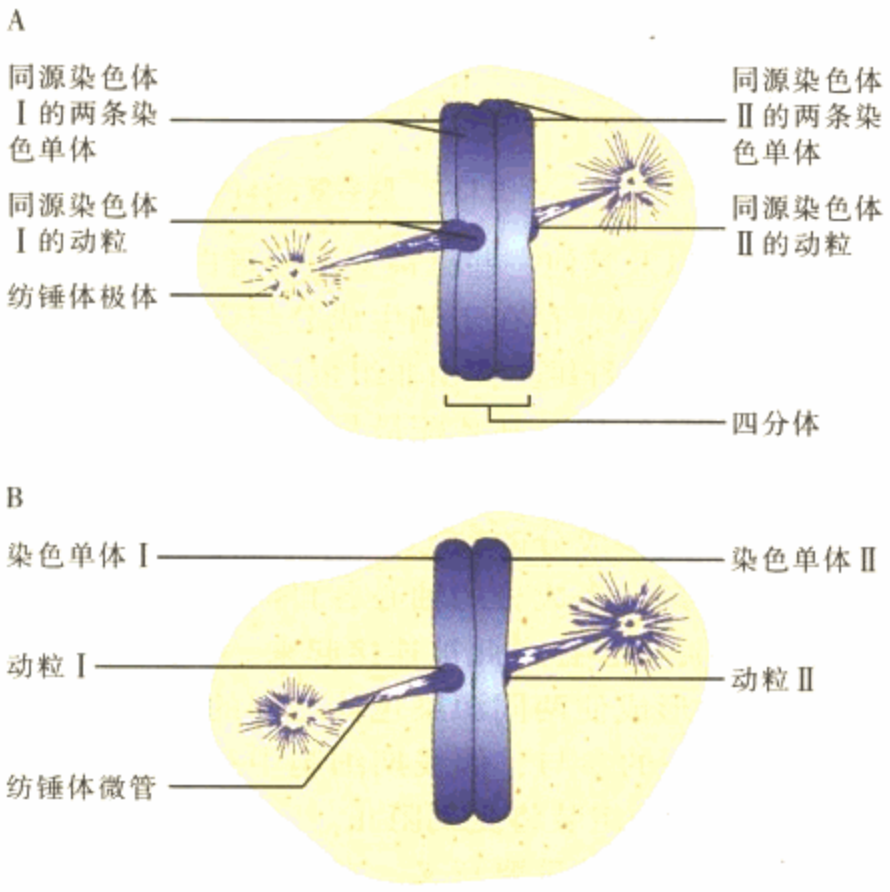
DNA 序列以及蛋白质序列识别分子，由此构成一个有组织的网络，从而促使了同源染色体之间的配对进一步发展，直至完成。

（3）粗线期：粗线期（pachytene stage）开始于同源染色体联会之后。通过联会紧密结合在一起的两条同源染色体，因进一步的凝集而缩短、变粗，同源染色体间出现染色体片段的交换及重组。在联会复合体中央新出现一些椭圆形或球形，富含蛋白质及酶的棒状结构，称为重组小结（recombination nodule），多个重组小结相间地分布于联会复合体上，可能与染色体片段的重组直接相关。在粗线期核仁融合成一个大核仁，并与核仁形成中心所在的染色体相连。在生化活动方面，粗线期细胞不仅能合成减数分裂特有的组蛋白，同时也可进行少量的 DNA 合成，该期所合成的 DNA 称为 P-DNA，可在交换过程中 DNA 链的修复、连接等方面发挥作用。

（4）双线期：双线期（diplotene stage）开始于同源染色体的去联会。联会复合体发生去组装，逐渐趋于消失，紧密配对的同源染色体相互分离，仅在非姐妹染色单体之间的某些部位上，残留一些接触点，称为交叉（chiasma）。交叉被认为是粗线期同源染色体交换的形态学证据，其数量与物种、细胞类型、染色体长度有关，一般每个染色体至少有一个交叉，染色体较长，交叉也较多。人类平均每对染色体的交叉数为 2~3 个。交叉的分布与重组小结有关。已经知道，交叉节与重组小结在总的数量上是相等的，而在联会染色体上的分布方式两者也存在一致性，果蝇中因某些突变的发生，交叉分布出现异常，重组频率降低，与此同时，重组小结发生数量减少和分布改变，从而证实重组小结与染色体交换的发生有关。

在双线期，同源染色体的四分体结构显得非常清晰，较易被观察到。随着双线期的进行，交叉将逐渐远离着丝粒，向染色体臂的末端部推移，数目也由此减少，此现象称为交叉端化（chiasma terminalization），这一过程将持续到中期，其机制目前尚不清楚，可能与同源染色体着丝粒间存在某种排斥有关。交叉端化的存在表明交叉与交换的位置二者并不能完全等同。随着交叉端化的进程，二价体可呈现 V、8、X、O 等形状，这一特征可作为此期的判断标志。

在某些生物中，持续时间长是该期细胞的另一特点，例如，人卵母细胞的双线期就可持续 50 年之久，两栖类卵母细胞的双线期持续时间近一年。



●图 13-8　减数分裂中期Ⅰ染色体（A）与有丝分裂中期染色体（B）动粒微管连接方式比较

（5）终变期：终变期（diakinesis stage）的特点是染色体的再凝集。同源染色体进一步凝集，显著缩短、变粗成短棒状。交叉端化继续进行。终变期末，同源染色体仅在其端部靠交叉结合在一起，形态上呈现出多态性。核仁消失，中心体已完成复制，移向两极后形成纺锤体。核膜逐渐解体，纺锤体伸入核区，在其作用下染色体开始移向细胞中部的赤道面上。终变期结束标志着前期Ⅰ完成。

2. 中期Ⅰ　以端化的交叉连接在一起的同源染色体即四分体，向细胞中部汇集，最终排列于细胞的赤道面上，通过动粒微管分别与细胞不同极相连。虽然此时每一染色体仍有两个动粒，但一侧纺锤体动粒微管只连接于同侧的动粒上（图 13-8），此点与有丝分裂不同。

3. 后期Ⅰ　受纺锤体微管的作用，同源染色体彼此分离并开始移向细胞的两极。此时每极的染色体数为细胞原有染色体数的一半，但每条染色体包含了两条染色单体。同源染色体向两极的移动是随机的，因此，非同源染色体之间以自由组合的方式进入两极。

同源染色体间的交叉对于其分离的过程可能有重要的作用，如某些联会的同源染色体在彼此间缺乏交叉的情况下，正常分离受阻，所产生的子代细胞中染色体数目将发生增多或减少等异常。人类常见的一些染色体病，如唐氏综合征等的病因即与上述染色体不分离有关。

4. 末期Ⅰ　到达细胞两极的染色体去凝集，逐渐成为细丝状的染色质纤维，核仁和核膜重新出现，胞质分裂后，两个子代细胞形成，各含比亲代细胞（2n）少一半的染色体（n），每条染色体着丝粒上连接有两条染色单体。某些生物在末期Ⅰ，细胞中的染色体不发生去凝集，而依然保持凝集状态。

（二）第一次减数分裂后出现短暂的间期

与有丝分裂间期相比，减数分裂间期通常持续时间较短，不发生 DNA 合成，无染色体复制，细胞中染色体数目已经减半。某些生物第一次减数分裂结束后，可以不经过这一间期，而直接进入第二次减数分裂的过程。

（三）第二次减数分裂与有丝分裂过程相似

第二次减数分裂可分为前期Ⅱ、中期Ⅱ、后期Ⅱ、末期Ⅱ、胞质分裂等 5 个时期。在前期Ⅱ去凝集染色体再次发生凝集，呈棒状或杆状形态，每一染色体由两条单体组成。纺锤体逐渐形成，不同极的动粒微管分别与每一染色体上的两个动粒相连，并使其逐渐向细胞中央的赤道面移动。前期Ⅱ末，核仁、核膜消失。中期Ⅱ时，染色体排列在赤道面上，随后其姐妹染色单体在着丝粒处发生断裂，彼此分离，经纺锤体动粒微管牵引进入两极，去凝集后又成为染色质纤维，核仁和核膜重新出现，胞质分裂完成后，新的子代细胞形成，其染色体数目（n）与此次分裂前相同。

在第二次减数分裂结束时，一个亲代细胞共形成 4 个子代细胞，各子代细胞中染色体数目与分裂前相比，均减少了一半，子代细胞间在染色体组成及组合上也存在差异，这些变化主要在第一次减数分裂中完成。

减数分裂与有丝分裂之间的联系和区别小结如下（表 13-1）：

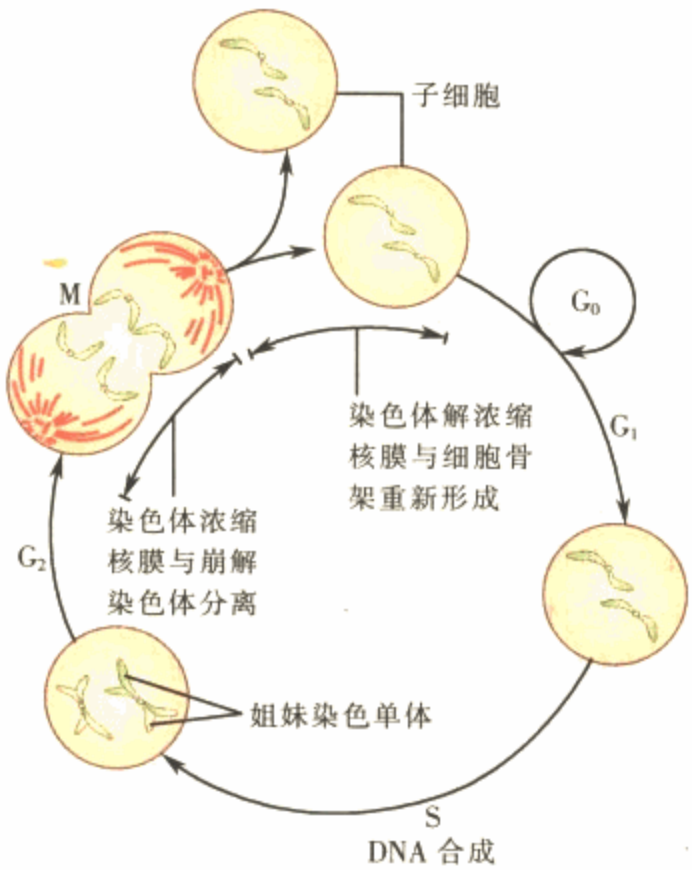
表 13-1　减数分裂与有丝分裂的比较

	有丝分裂	减数分裂
发生范围	体细胞	生殖细胞
分裂次数	1	2
分裂过程		
前期	无染色体的配对、交换、重组	有染色体的配对、交换、重组（前期Ⅰ）
中期	二分体排列于赤道面上，动粒微管与染色体的两个动粒相连	四分体排列于赤道面上，动粒微管只与染色体的一个动粒相连（中期Ⅰ）
后期	染色单体移向细胞两极	同源染色体分别移向细胞两极（后期Ⅰ）
末期	染色体数目不变	染色体数目减半（末期Ⅰ）
分裂结果	子代细胞染色体数目与分裂前相同，子代细胞遗传物质与亲代细胞相同	子代细胞染色体数目比分裂前少一半，子代细胞遗传物质与亲代细胞及子代细胞之间均不相同
分裂持续时间	一般为 1～2h	较长，可为数月、数年、数十年

第二节　细胞周期及其调控

一、细胞周期的基本概念

在哺乳动物和人等高等生物，细胞周期可首先分为分裂期（mitosis）和分裂间期（interphase）两个基本的部分，其中，包含核分裂和胞质分裂的分裂期（M 期）持续时间很短，而间期占据了细胞周期的 95%以上的时间。在分裂间期，染色质松散地分布于整个核内，因此，光学显微镜下核的形态学特点是均质的。但实际上，间期细胞正积极地为分裂做准备，此期内 DNA 复制有序地发生，细胞以稳定的速率生长。根据 DNA 合成的情况，细胞间期可被进一步划分为 G_1 期又称为 DNA 合成前期，处于 S 期与上次分裂期之间，S 期 DNA 复制所需的多种酶与蛋白质即在 G_1 期合成；S 期为 DNA 合成期；G_2 期也被称为 DNA 合成后期，是 S 期与下次分裂期之间的一个时段，G_2 期发生的生化变化，可为 S 期向 M 期的转变提供条件（图 13-9）。



●图 13-9　细胞周期示意图

在机体的不同发育阶段和不同种类的细胞中细胞周期持续时间差别很大，例如，典型的快速增殖的人的体细胞的细胞周期时间是 24 小时，其中 G_1 期约 11 小时，S 期约 8 小时，G_2 期 4 小时，M 期 1 小时。另外一些细胞的周期则短得多，例如芽殖酵母的细胞周期仅 90 分钟，受精卵早期的细胞周期可能短于 30 分钟，此时不发生细胞生长，分裂很快，缺乏 G_1 期和 G_2 期，由于 DNA 复制很快，因此 S 期很短。另外，体内有些细胞如神经元细胞完全停止分裂，而另外一些细胞（皮肤成纤维细胞和肝实质细胞）必须在需要替换损伤或死亡的细胞时才出现分裂。一般情况下，这类细胞退出 G_1 期，进入了一个称为 G_0 期静息的阶段，此时这些细胞保持代谢活性但仅仅在接收到适当的细胞外信号后才进入细胞周期。

在分裂期中，细胞的形态发生了光镜下容易被观察到的显著变化，例如染色体凝集、核膜破裂、纺锤体出现及细胞一分为二等。但在两次有丝分裂之间的分裂间期中，细胞的形态结构并不发生明显的变化，因此人们曾一度认为间期中细胞活动是静止的。直到 20 世纪 50 年代以后，随着放射自显影、细胞化学、免疫荧光等现代细胞生物学技术的应用，人们才发现间期细胞中进行着非常活跃的蛋白质、核酸等物质的合成，生命遗传物质DNA 的复制即在此期中完成。经过分裂期产生的子代细胞在间期开始生长，并为它们进入各自的下一个分裂期做物质上的准备。细胞间期不同时限的细胞的识别可以通过细胞的DNA 含量来确认，也可利用放射性自显影技术测定其放射性胞嘧啶吸收率进行鉴定。

在高等生物中，一个细胞周期通常持续 12~32h，分裂期所需时间较短，因此，间期，尤其是 G_1 期，是影响细胞周期时间的关键（表 13-2）。G_1 期的时间长度与 G_1 期细胞中的某些特殊的 mRNA 及蛋白质的积累相关。此外，激素、生长因子等环境因素也能影响细

表 13-2　哺乳动物细胞周期的时间

细胞类型	T_C	T_{G1}	T_S	T_{G2+M}
人				
结肠上皮细胞	25.0	9.0	14.0	2.0
直肠上皮细胞	48.0	33.0	10.0	5.0
胃上皮细胞	24.0	9.0	12.0	3.0
骨髓细胞	18.0	2.0	12.0	4.0
大鼠				
十二指肠隐窝细胞	10.4	2.2	7.0	1.2
内釉质上皮细胞	27.3	16.0	8.0	3.3
淋巴细胞	12.0	3.0	8.0	1.0
肝细胞	47.5	28.0	16.0	3.5
精原细胞	60.0	18.0	24.5	15.5 + 2.0
小鼠				
小肠隐窝上皮	13.1	4.6	6.9	1.0 + 0.7
十二指肠上皮细胞	10.3	1.3	7.5	1.5
结肠上皮细胞	19.0	9.0	8.0	2.0
皮肤上皮细胞	101.0	87.0	11.82	2.18
乳腺上皮	64.0	37.7	21.7	3 + 1.6

注：T_C 细胞周期；T_{G1}、T_S、T_{G2+M} 分别为 G_1、S 期、G_2/M 期的时间。

胞周期长短，如环境温度高于 39℃或低于 36℃，细胞周期各时相的时间将随之按比例地变化。

二、细胞周期各时相的动态变化与生物大分子的合成

（一）G_1 期是 DNA 复制的准备期

G_1 期的主要特点是细胞中进行着活跃的 RNA 及蛋白质合成，细胞体积显著增大，RNA 聚合酶活性升高，使得 rRNA、tRNA、mRNA 不断地产生，蛋白质含量也迅速增加。G_1 期中合成的蛋白质包括 S 期 DNA 复制起始与延伸所需的酶类，如 DNA 聚合酶，也包括 G_1 期向 S 期转换过程中起重要作用的一些蛋白质，如：触发蛋白、钙调蛋白、细胞周期蛋白、抑素等。目前已经知道，在 G_1 期与 S 期之间有一个限制点，G_1 期细胞一旦通过此点，便能完成随后的细胞周期进程。G_1 期蛋白质量的增加，可能与蛋白质合成增强有关，而也可能是其降解减弱所致。

G_1 期另一个较为突出的特点是细胞中发生了多种蛋白质的磷酸化，如组蛋白、非组蛋白及某些蛋白激酶的磷酸化。组蛋白 H_1 分子的磷酸化发生于其分子-COOH 末端部分的丝氨酸上，随着细胞周期进程的发展，磷酸化的 H_1 分子将逐渐增多，从而促进 G_1 晚期染色体结构成分的重排。G_1 期蛋白激酶的磷酸化大多发生于其丝氨酸或苏氨酸、酪氨酸部位。

在 G_1 期，细胞膜对物质的转运作用加强，细胞对氨基酸、核苷酸、葡萄糖等小分子营养物质摄入量增加，保证了 G_1 中进行的大量生化合成有充足的原料。此外，细胞对一些可能参与 G_1 期向 S 期转变调控物质的转运也增加，cAMP 含量在 G_1 期早期增加迅速，K^+可因 Na^+-K^+-ATP 酶活性在 G_1 期发生短暂的升高而大量流入细胞。如果用药物抑制 K^+积

累（或 Na^+等），细胞周期的进程将被阻断。

上述细胞膜对物质转运能力的增强与 G_1 期细胞膜的变化相关。多种因素如胆固醇、各种生长因子受体、酪氨酸磷酸化作用及一定蛋白的插入均可对细胞膜的转运作用产生影响。胆固醇是动物细胞质膜主要结构成分之一，在 G_1 期中合成显著增加，如抑制胆固醇合成，将会抑制细胞进入 S 期。

（二）S 期中完成 DNA 复制

S 期是细胞周期进程中最重要的一个阶段，此期细胞主要的特征是进行大量的 DNA 复制，同时也合成组蛋白及非组蛋白，最后完成染色体的复制。

DNA 复制是在多种酶的参与下完成的。细胞由 G_1 期进入 S 期时，DNA 合成所需的酶类，如 DNA 聚合酶、DNA 连接酶、胸腺嘧啶核苷激酶、核苷酸还原酶等含量或活性显著增高。DNA 复制遵循严格的时间顺序。通常，早复制的多为 GC 含量较高的 DNA 序列，而晚复制的 DNA 序列 AT 含量较高。常染色质的复制在先，异染色质复制在后，如人类女性细胞中钝化的 X 染色体复制发生于其他染色体复制完成以后。

S 期是组蛋白合成的主要时期，在时间上组蛋白的合成与 DNA 复制是同步进行、相互依存的。伴随着 DNA 的复制，胞质中组蛋白 mRNA 大量增加，新合成的组蛋白迅速进入胞核，与已复制的 DNA 结合，组装成核小体，进而形成具有两条单体的染色体。当 DNA 复制在 S 期末完成，组蛋白 mRNA 也在短时间发生大量的降解。如果 S 期 DNA 复制被羟基脲、阿糖胞苷等物质抑制，细胞中组蛋白 mRNA 的水平也将发生并行性降低，组蛋白合成由此停止。反之，用环己亚胺、嘌呤霉素、土根碱等抑制 S 期组蛋白的合成，DNA 的合成速率会迅速降低，进而在数秒钟内停止。

组蛋白持续的磷酸化也发生于 S 期。继 G_1 期进行丝氨酸磷酸化后，在 S 期 H_1 上另外两个丝氨酸位点也将发生磷酸化。而 H_2A 的磷酸化则贯穿于整个细胞周期。

中心粒的复制完成于 S 期。首先是相互垂直的一对中心粒彼此发生分离，然后各自在其垂直方向形成一个子中心粒，所形成的两对中心粒将作为微管组织中心，随着细胞周期进程的延续，在纺锤体微管、星体微管等的形成中发挥作用。

（三）G_2 期是细胞分裂的准备期

此期细胞中大量合成 RNA、ATP 及一些与 M 期结构功能相关的蛋白质，如，作为 M 期纺锤体微管形成基本单位的微管蛋白，其合成在 G_2 期达到高峰，这为纺锤体的构建提供了丰富来源。另外，对核膜破裂、染色体凝集有重要作用的成熟促进因子也是在 G_2 期合成的。G_2 期所合成的某些特定蛋白为 G_2 期向 M 期转化所必需，如果缺乏这些蛋白，G_2 期细胞将不能进入分裂期。

在 G_2 期，S 期已复制的中心粒此时体积逐渐增大，开始分离并移向细胞两极。

（四）M 期中细胞进行分裂

此期内细胞形态结构发生显著的改变，染色体凝集及分离，核膜、核仁破裂及重建，纺锤体、收缩环在胞质形成，继胞核发生分裂形成两个子核后，胞质一分为二，细胞完成分裂。M 期细胞的膜也发生显著变化，细胞变圆，根据这一特点，可进行细胞的同步化筛选。

在生化合成方面，可能因染色质凝集成染色体降低了其模板活性，该期细胞中 RNA 合成处于抑制状态，除了非组蛋白以外，细胞中蛋白质合成显著降低。

三、细胞周期的调控

细胞周期中细胞的生化与形态结构等方面的变化以及相邻时相间的转换，均是在

细胞本身及环境因素的严格控制下有序进行的。细胞中多种蛋白构成的复杂网络，可通过一系列有规律的生化反应对细胞周期主要事件加以控制，使细胞能对内外各种信号产生反应。G_1 期到 S 期、G_2 期到 M 期是细胞周期调控的两个关键的时期，不同的蛋白质或多肽因子作用于这些调控点后，可实现其对细胞周期的多因子、多层次调控。

（一）细胞周期蛋白与细胞周期蛋白依赖激酶构成细胞周期调控系统的核心

1. 细胞周期蛋白　细胞周期蛋白（cyclin）是真核细胞中的一类蛋白质，它们能随细胞周期进程周期性地出现及消失，由 T. Evans 等在 1983 年首次发现。Evans 等利用标记有放射性物质的氨基酸，对海胆受精卵蛋白质合成的情况进行定量检测。他们发现，在受精卵早期卵裂中，与大多数蛋白质含量呈稳定方式不同，某些蛋白质的含量随细胞周期的进程发生周而复始地合成与降解，如果用秋水仙素抑制细胞分裂，该类蛋白质的降解不会发生或被延缓，他们将这类蛋白质命名为细胞周期蛋白。

真核生物的细胞周期蛋白是一些功能相似的同源蛋白，由一个相关基因家族编码，种类多达数十种，哺乳动物的周期蛋白包括 cyclinA~H 几大类，酵母中有 Cln、Clb、Cig。在细胞周期的各特定阶段中，不同的周期蛋白相继表达，并与细胞中其他蛋白结合，对细胞周期相关活动进行调节。

在 G_1 期表达的细胞周期蛋白有 cyclinA、C、D、E，因 cyclinC、D、E 三种蛋白的表达仅限于 G_1 期，进入 S 期即开始降解，且只在 G_1 向 S 期转化过程起调节作用，因此又被称为 G_1 期蛋白。CyclinD 为细胞 G_1/S 期转化所必需，在哺乳动物中，存在三种具有组织及细胞特异性的 cyclinD，即 cyclinD1~3，分裂旺盛的细胞通常含有一种以上的 cyclinD。

cyclinA 的合成发生于 G_1 期向 S 期转变的过程中，在中期时消失，属 S 期周期蛋白。CyclinB 的表达开始于 S 期，在 G_2/M 时达到高峰，随着 M 期的结束而被降解、消失。

不同的周期蛋白在分子结构上存在共同的特点，即均含有一段氨基酸组成保守的细胞周期蛋白框（图 13-10）。该保守序列由 100 个左右的氨基酸残基组成，可介导周期蛋白与周期蛋白依赖性激酶结合，形成复合物，参与细胞周期的调节。

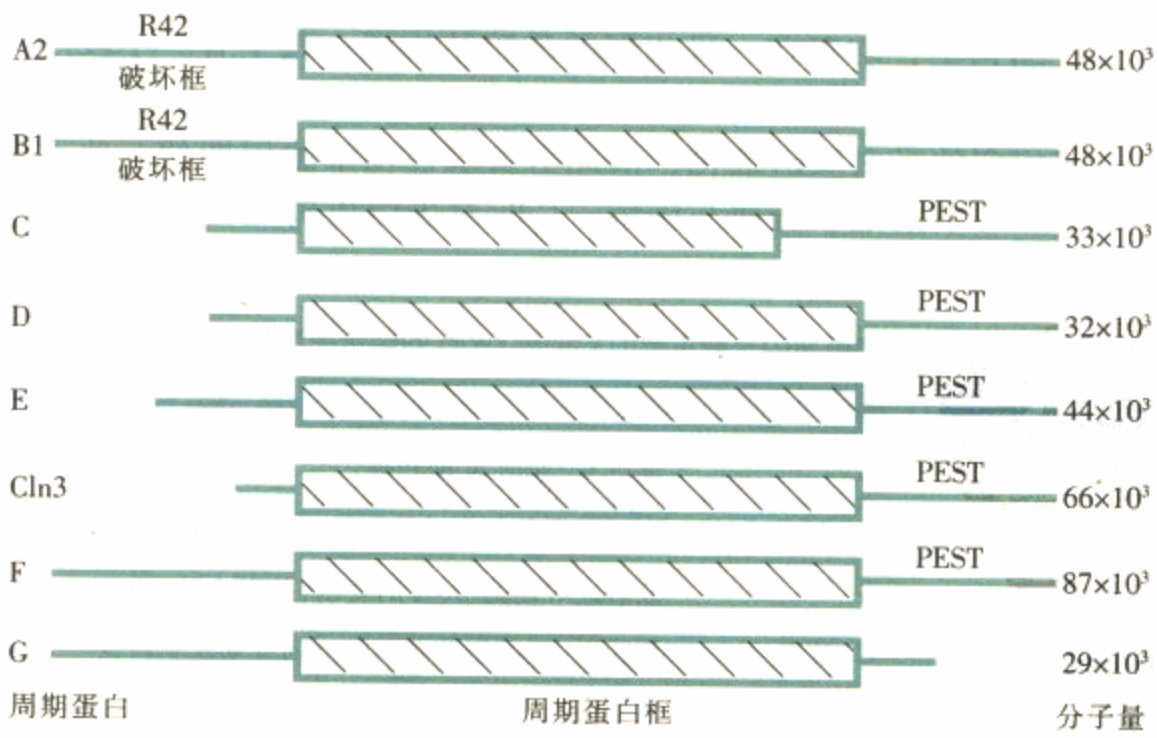
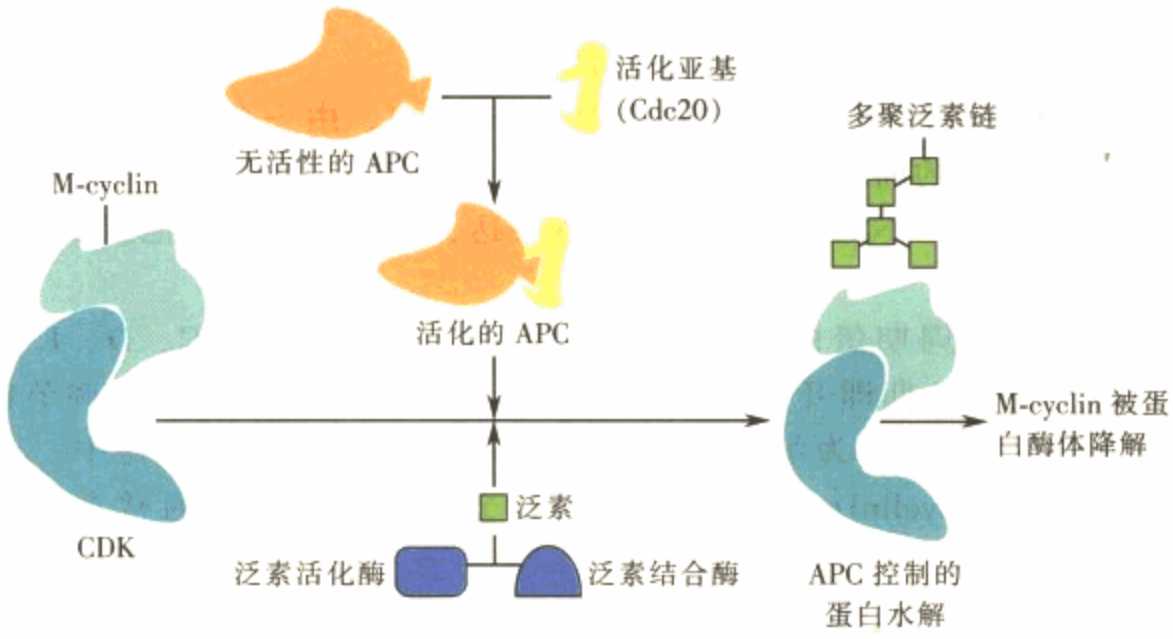


图 13-10　细胞周期蛋白框

在 S 期及 M 期周期蛋白的分子中还存在一段被称为破坏框的特殊序列，由 9 个氨基酸残基构成，位于蛋白质分子的近 N 端，可在中期以后 cyclinA、B 的快速降解中发挥作

用，G_1 期周期蛋白虽然分子结构不具破坏框，但也可通过其 C 末端的一段 PEST 序列的介导，发生降解。

CyclinA、B 常常是通过多聚泛素化途径被降解的。泛素是一种由 76 个氨基酸组成的高度保守的蛋白质，当其 C 端与非特异性泛素活化酶 E1 的半胱氨酸残基以硫酯键共价结合后，泛素被活化。E1-泛素复合体可将泛素转移到泛素结合酶 E2 的胱氨酸残基上，在一种特异性的，由多种蛋白亚基构成的泛素连接酶 E3（又称为后期促进复合物 anaphase-promoting complex，APC）的催化下，泛素连接于 cyclinA、B 分子破坏框附近的赖氨酸残基上，其他的泛素分子随后相继与前一个泛素分子的赖氨酸残基相连，这样在 cyclinA、B 上构成一条多聚泛素链。此链可作为标记物被一种大分子量的蛋白复合体，即蛋白酶体所识别，进而被其降解（图 13-11）。



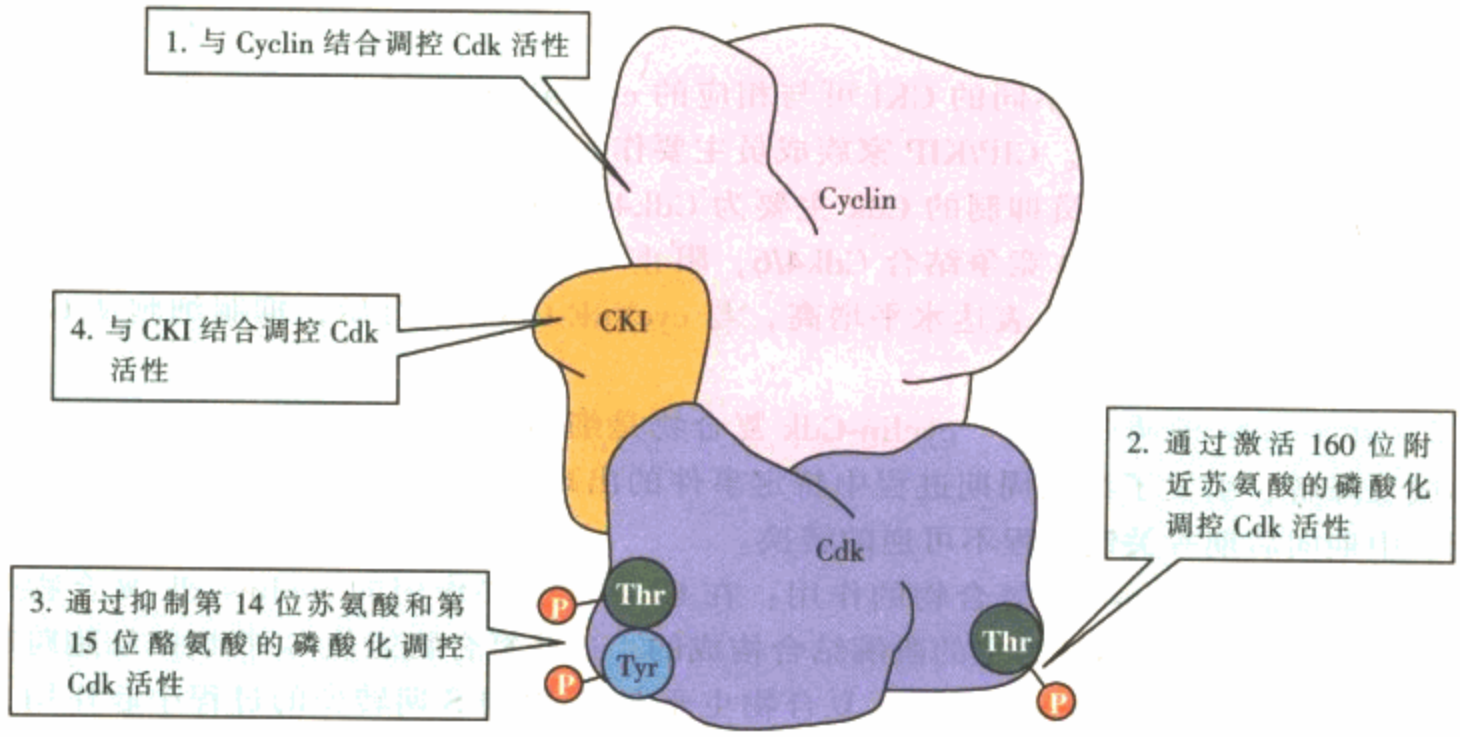
●图 13-11　cyclin A/B 经多聚泛素化途径被降解

2. 细胞周期蛋白依赖性激酶　细胞周期蛋白依赖性激酶（cyclin-dependent kinase，Cdk）为一类必须与细胞周期蛋白结合后才具有激酶活性的蛋白激酶，通过磷酸化多种与细胞周期相关的蛋白，Cdk 可在细胞周期调控中起关键作用。现已被鉴定的 Cdk 为 Cdk1~8。在不同的 Cdk 分子结构中，均存在一段相似的激酶结构域，其中有一小段序列具有高度保守性，是介导激酶与周期蛋白结合的区域。在细胞周期的各阶段，不同的 Cdk 通过结合特定的周期蛋白，使相应的蛋白质磷酸化，由此引发或控制细胞周期的一些主要事件。因细胞周期进程中 cyclin 可不断地被合成与降解，Cdk 对蛋白质磷酸化的作用也由此呈现出周期性的变化（表 13-3）。

表 13-3　细胞周期中一些主要的 Cdk 与 cyclin 的结合关系及作用特点

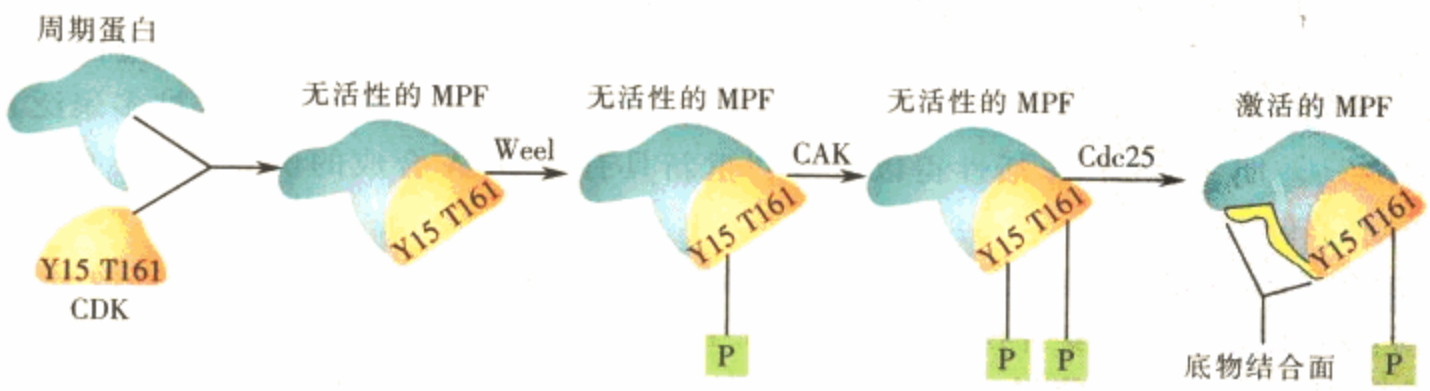
Cdk 类型	结合的 cyclin	主要作用时期	作　用　特　点
Cdk1	cyclinA	G_2	促进 G_2 期向 M 期转换
	cyclinB	G_2、M	磷酸化多种与有丝分裂相关的蛋白，促进 G_2 期向 M 期转换
Cdk2	cyclinA	S	能启动 S 期的 DNA 的复制，并阻止已复制的 DNA 再发生复制
	cyclinE	G_1 晚期	使晚 G_1 期细胞跨越限制点向 S 期发生转换
Cdk3	?	G_1	
Cdk4	cyclinD(D1\D2\D3)	G_1 中、晚期	使晚 G_1 期细胞跨越限制点向 S 期发生转换
Cdk5	?	G_0?	
Cdk6	cyclinD(D1\D2\D3)	G_1 中、晚期	使晚 G_1 期细胞跨越限制点向 S 期发生转换

Cdk 的激酶活性需要在 cyclin 及磷酸化双重作用下才能被激活。裂殖酵母中，处于非磷酸化状态的无活性的 Cdk 分子中含有一个弯曲的环状区域，称为 T 环，该结构将 Cdk 的袋状催化活性部位入口封闭，阻止了蛋白底物对袋状催化活性部位深处活性位点的附着。当非磷酸化的 Cdk 与 cyclin 结合后，cyclin 与 T 环彼此间发生强烈的相互作用，引起 T 环结构位移、缩回，袋状催化活性部位入口打开，活性位点暴露。而位于 Cdk N 端的一段 α-螺旋此时也旋转 90°，重新定位，其底物附着位点由此转向 Cdk 袋状催化活性部位分布，此时的 Cdk 激酶活性较低，仅在体外实验中检测得到。图 13-12 显示了影响 Cdk 活性的因素。



●图 13-12　影响 Cdk 活性的因素

与 cyclin 结合的 Cdk 要完全活化，还必须依赖 Cdk 分子的进一步磷酸化。磷酸化发生于 Cdk 的两个氨基酸残基位点，即活性的第 161 位苏氨酸残基（Thr161）与抑制性的第15位酪氨酸残基（Tyr15）。Thr161 位于 T 环上，在经 Cdk 活化激酶 CAK 磷酸化后，Cdk-cyclin 复合物上底物附着部位形状显著改变，与底物的结合能力进一步增强，与未磷酸化时相比，Cdk 催化活性可提高 300 倍。Tyr15 存在于 Cdk 与 ATP 结合的区域，其磷酸化过程由 weel 激酶催化，发生于 Thr161 前。当 Thr161 被磷酸化后，Tyr15 在 Cdc25 磷酸酶的催化下再发生去磷酸化，Cdk 才最终被激活。在脊椎动物中，Cdk 蛋白上第 14 位苏氨酸残基（Thr14）与 Tyr15 一样，分布于 Cdk 与 ATP 结合部位，因此 Cdk 的激活，还需要myt 激酶对 Thr14 进行的磷酸化及随后 Cdc25 磷酸酶对 Thr14 的去磷酸化（图 13-13，MPF 为细胞周期蛋白与 Cdk 形成的复合物）。



●图 13-13　多重磷酸化对 Cdk 活性的影响

Cdk 的活性也受到 Cdk 激酶抑制物（Cdk inhibitor，CKI）的负性调节。已证实有多种 CKI 存在，根据分子量的差异，哺乳动物的 CKI 可被分为 CIP/KIP 及 INK4 两大家族，属 CIP/KIP 家族成员的 CKI 有 $p21^{Cip1/Waf1}$、$p27^{Kip1}$、$p57^{Kip}$ 等，而 INK4 家族成员则包括$p16^{INK4}$、$p15^{INK4}$、$p18^{INK4}$ 等。

CKI 对 Cdk 的抑制作用是通过与 cyclin-Cdk 复合物结合，改变 Cdk 分子活性位点空间位置来实现的。$p27^{Kip1}$ N 端的一部分可与 Cdk2-cyclinB 复合物的 cyclin 相连，而 N 端的另一些区域则插入到 Cdk2 N 端，Cdk2 结构由此受到严重的扰乱。此外，在 $p27^{Kip1}$ 分子上存在一个类似于 ATP 的区域，可结合于 Cdk 分子的 ATP 结合位点上，从而阻止 ATP 对Cdk 的附着。通过以上两种方式，$p27^{Kip1}$ 可抑制 Cdk2-cyclinB 复合体中 Cdk 的活性。

在细胞周期各阶段，不同的 CKI 可与相应的 cyclin-Cdk 复合物结合，形成三元复合物，参与细胞周期的调控。CIP/KIP 家族成员主要作用于 Cdk2/4，其中 $p21^{Cip1/Waf1}$ 作用则更为广泛。受 INK4 家族成员抑制的 Cdk 主要为 Cdk4/6。G_1 期与 S 期是 CKI 作用的主要阶段，$p16^{INK4}$ 通过与 cyclin D 竞争结合 Cdk4/6，阻止 G_1 期细胞通过限制点向 S 期转换。在 DNA 发生损伤时，$p21^{Cip1/Waf1}$ 表达水平增高，与 cyclinE-Cdk2 结合后，抑制细胞从 G_1 期转向 S 期。

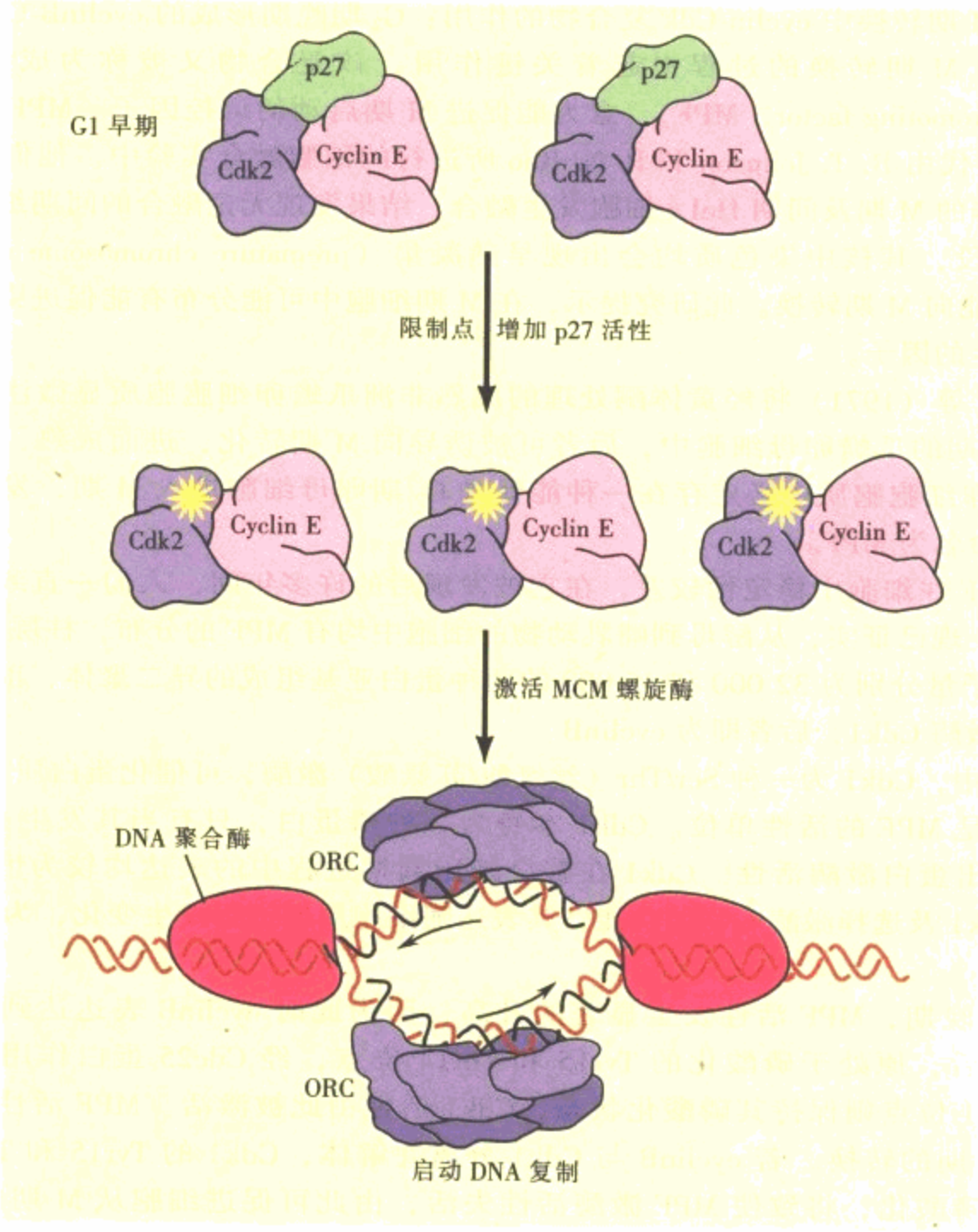
3. cyclin-Cdk 的调控作用　cyclin-Cdk 复合物是细胞周期调控体系的核心，其周期性的形成及降解，引发了细胞周期进程中特定事件的出现，并促成了 G_1 期向 S 期、G_2 期向 M 期、中期向后期等关键过程不可逆的转换。

（1）G_1 期中 cyclin-Cdk 复合物的作用：在 G_1 期起主要作用的 cyclin-Cdk 复合物是由 G_1 期 cyclinD、E 与 Cdk4/6 为主的激酶结合构成的，这些复合物能使 G_1 晚期的细胞跨越限制点，向 S 期发生转换。cyclinD-Cdk 复合物主要在 G_1 期向 S 期转变的过程中起作用，在一些向 S 期转变的 G_0 期细胞中，存在 cyclinD 的转录及表达，而当 cyclinD 抗体加入后，G_0 期细胞的这一转换将受阻。而 cyclinE-Cdk 复合物则为 S 期的启动所必需。如果果蝇胚胎细胞中的 *cyclinE* 基因发生突变，细胞将滞留于 G_1 期。向 G_1 期细胞中显微注射特异性的 cyclinE 抗体，细胞向 S 期的转变受到抑制。相反，如果用某些方法促进 cyclinE 在细胞中高表达，则 G_1 期细胞将迅速转入 S 期（图 13-14）。

与 G_1 期 cyclin-Cdk 复合物作用相关的主要生化事件是：cyclinD 首先在细胞中大量合成，Cdk4、6 与其结合，通过激酶活化细胞中的某些转录因子。G_1 期的晚期 cyclinE 逐渐合成、积累并与 Cdk2 结合，在 G_1/S 期 cyclinE 与 Cdk2 复合物活性达到最高，细胞中的其他一些转录因子随之被活化，由此启动了与 DNA 复制相关基因的表达，产生一系列 DNA 合成所需的酶与蛋白质，为细胞进入 S 期做准备。

磷酸化 S 期 cyclin-Cdk 复合物抑制蛋白，使其经多聚泛素化途径被降解，是 G_1 期 cyclin-Cdk 复合物控制 G_1 期向 S 期转变的又一种方式。S 期 cyclin-Cdk 抑制蛋白是一种表达于 G_1 期早期的特异性抑制 S 期 cyclin-Cdk 的因子，S 期 cyclin-Cdk 在 G_1 期一经合成，即被该抑制蛋白结合，活性丧失。在 G_1 期晚期，S 期 cyclin-Cdk 抑制蛋白在 G_1 期 cyclin-Cdk 复合物作用下发生磷酸化，经泛素结合酶及泛素连接酶识别后，被多聚泛素化，最终降解，S 期 cyclin-Cdk 活性得以恢复，重新具有对 DNA 合成的诱导能力，G_1 期进一步向S 期的转换。

（2）S 期中 cyclin-Cdk 复合物的作用：当细胞进入 S 期后，cyclin-Cdk 复合物主要的变化包括：cyclinD/E-Cdk 复合物中的 cyclin 发生降解，cyclinA-Cdk 复合物形成。因 cyclinD/E 的降解是不可逆的，使得已进入 S 期的细胞将无法向 G_1 期逆转。cyclinA-Cdk 复合物是 S 期中最主要的 cyclin-Cdk 复合物，能启动 DNA 的复制，并阻止已复制的 DNA 再发生



● 图 13-14　cyclinE-Cdk 复合物和 S 期的启动

复制。

关于 cyclinA-Cdk 复合物启动 DNA 复制的机制，目前认为与真核细胞 DNA 分子复制起始点及其附近 DNA 序列上一个由多种蛋白构成的复合体，即预复制复合体结构有关。cyclinA-Cdk 复合物利用其激酶活性可使该蛋白复合体某些位点发生磷酸化，预复制复合体由此被激活，DNA 合成开始启动。此外，cyclinA-Cdk 复合物还可通过磷酸化作用，使预复制复合体中的某些蛋白具有解旋酶的功能，在 DNA 复制点处将 DNA 双链打开，当其他与 DNA 合成相关的酶，如 DNA 聚合酶等在打开的 DNA 双链处汇集后，DNA 复制将随之发生。

在 DNA 复制启动后，预复制复合体中的蛋白质可在 cyclinA-Cdk 复合物作用下发生分离，预复制复合体解体，在原复制起始点上 DNA 将不能再次进行复制。cyclinA-Cdk 复合物还可进一步对组成预复制复合体的蛋白质进行磷酸化，导致其降解或向核外转运，阻止了预复制复合体在其他复制起始点的重新聚合装配，使 DNA 复制不会再启动。cyclinA-Cdk 复合物通过上述机制，保证了 S 期细胞 DNA 只能复制一次，cyclinA-Cdk 复合物的这一作用能继续维持到 G_2 及 M 期，因此直至有丝分裂后期染色单体彼此未发生分离前，DNA 均无法再进行复制。

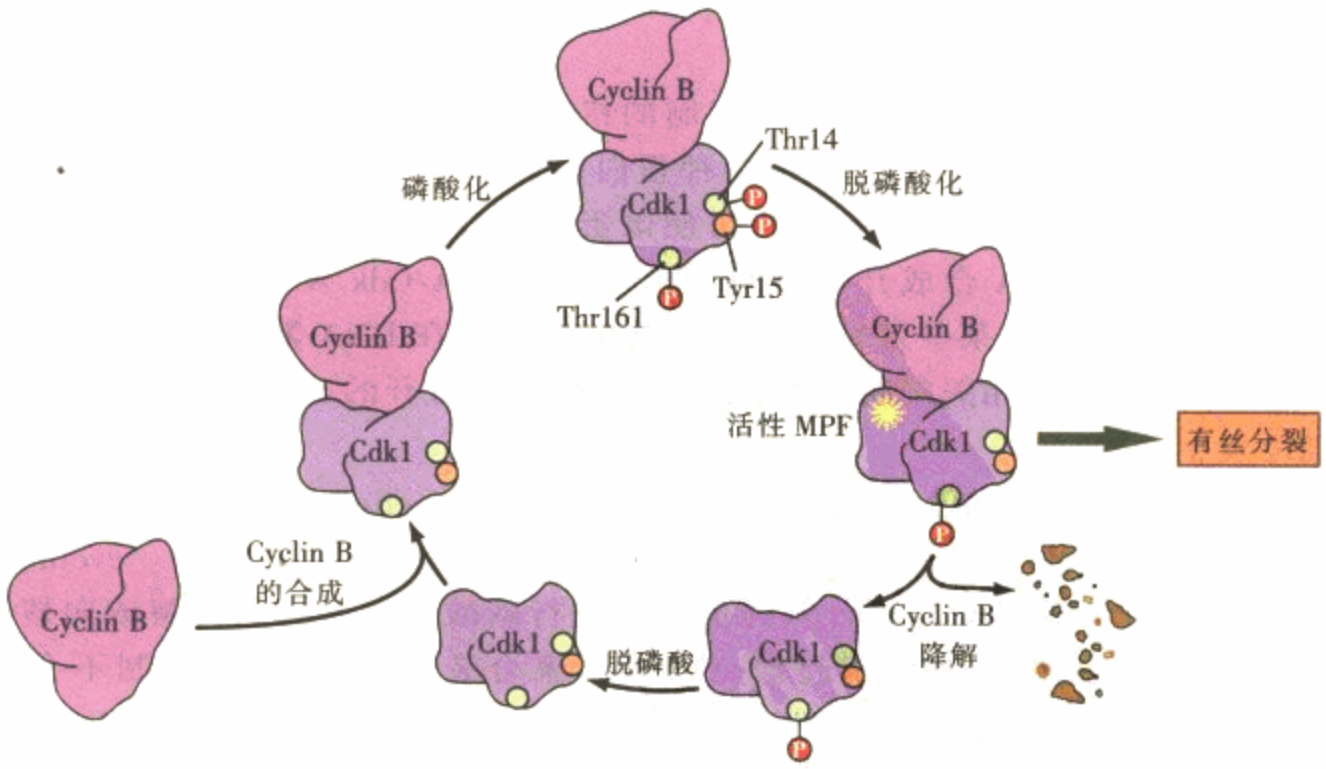
（3）G_2/M 期转换中 cyclin-Cdk 复合物的作用：G_2 期晚期形成的 cyclinB-Cdk 复合物在促进 G_2 期向 M 期转换的过程中起着关键作用，该复合物又被称为成熟促进因子（maturation promoting factor，MPF），意为能促进 M 期启动的调控因子。MPF 最早发现于 20 世纪 70 年代由 R. T. Johnson 和 P. N. Rao 所进行的细胞融合实验中。他们用人工方法诱导体外培养的 M 期及间期 HeLa 细胞发生融合，结果发现无论融合的间期细胞处于细胞周期何种阶段，其核中染色质均会出现早熟凝集（premature chromosome condensation，PCC），并都能向 M 期转换。此研究提示，在 M 期细胞中可能分布有能促进染色质凝集及有丝分裂发生的因子。

Y. Masui 等（1971）将经黄体酮处理的成熟非洲爪蟾卵细胞胞质显微注射到未成熟的，处于 G_2 期的爪蟾卵母细胞中，后者可被诱导向 M 期转化，进而成熟，据此他们认为，在成熟卵细胞胞质中必定存在一种能促进 G_2 期卵母细胞进入 M 期，发育成熟的物质，并将其命名为 MPF。

由于 MPF 在细胞中稳定性较差，在它被发现后的许多年间，人们一直致力于其纯化及鉴定工作。现已证实，从酵母到哺乳动物的细胞中均有 MPF 的分布，柱层析结果表明，MPF 是由分子量分别为 32 000 和 45 000 的两种蛋白亚基组成的异二聚体，前者为细胞周期蛋白依赖激酶 Cdk1，后者即为 cyclinB。

在 MPF 中，Cdk1 为一种 Ser/Thr（丝氨酸/苏氨酸）激酶，可催化蛋白质 Ser 与 Thr 残基磷酸化，是 MPF 的活性单位。Cdk1 本身为一种磷蛋白，只有当其发生去磷酸化时，才可以表现出蛋白激酶活性。Cdk1 在整个细胞周期进程中的表达均较为恒定。cyclinB 具有激活 Cdk1 及选择激酶底物的功能，其表达随细胞周期进程发生变化，为 MPF 的调节单位。

在 G_2 期晚期，MPF 活性发生显著的升高，因为此时 cyclinB 表达达到峰值，Cdk1 在与其结合后，原处于磷酸化的 Tyr15 和 Thr14 位点，经 Cdc25 蛋白作用发生去磷酸化，而Thr161 位点则保持其磷酸化状态，Cdk1 活性由此被激活。MPF 活性增高，促进了 G_2 期向M 期的转换。若 cyclinB 与 Cdk1 分离并解体，Cdk1 的 Tyr15 和 Thr14 氨基酸残基又发生磷酸化，将致使 MPF 激酶活性失活，由此可促进细胞从 M 期向 G_1 期转化（图 13-15）。



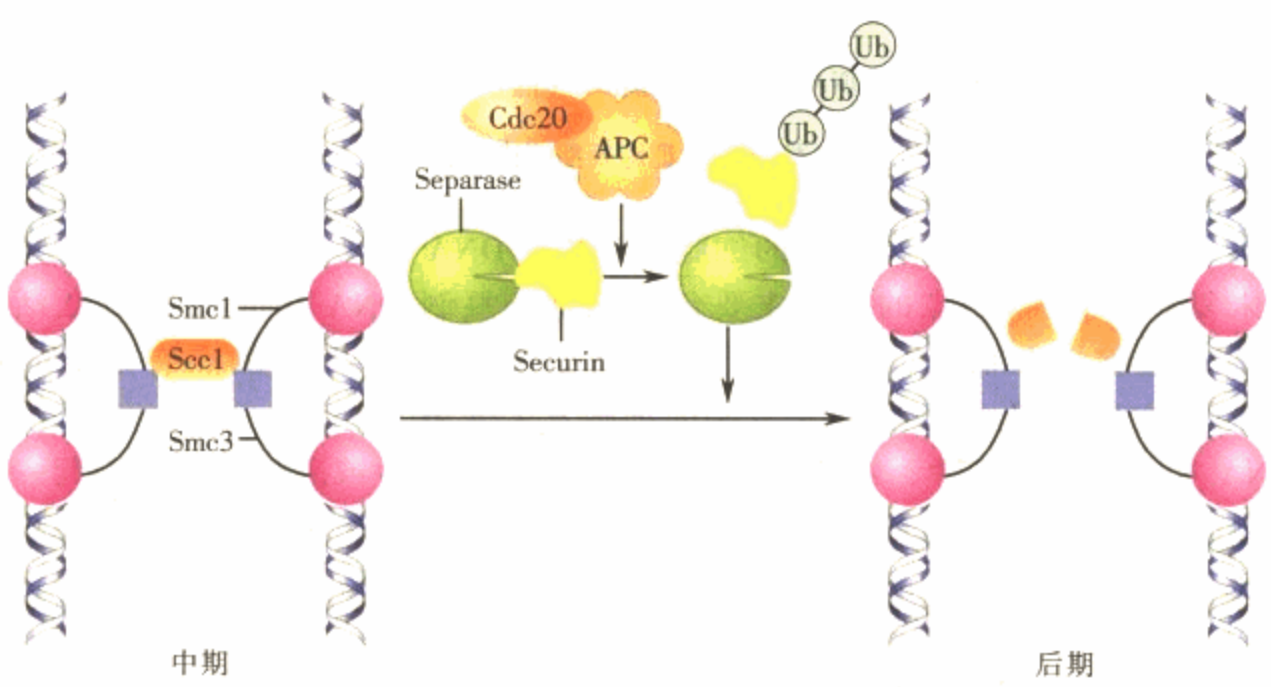
●图 13-15　MPF 的调控作用

（4）M 期中 cyclin-Cdk 复合物的作用：M 期细胞在形态结构上所发生的变化以及中期向后期、M 期向下一个 G_1 期的转换均与 MPF 相关。

在细胞由 G_2 期进入 M 期后，依赖于其蛋白激酶活性，MPF 可对 M 期早期细胞形态结构变化产生直接或间接的作用。MPF 与染色体的凝集直接相关。在细胞分裂的早、中期，MPF 可通过磷酸化组蛋白 H_1 上与有丝分裂有关的特殊位点诱导染色质凝集，启动有丝分裂。MPF 也可直接作用于染色体凝集蛋白，散在的 DNA 分子结合于磷酸化的凝集蛋白上后，沿其表面发生缠绕、聚集，介导了染色体形成超螺旋化结构，进而发生凝集。

核纤层蛋白（lamin）也是 MPF 的催化底物之一，核纤层蛋白经 MPF 作用后，其特定的丝氨酸残基可发生高度磷酸化，由此引起核纤层纤维结构解体，核膜破裂成小泡。MPF 也能对多种微管结合蛋白进行磷酸化，进而调节细胞周期中微管的动态变化，使微管发生重排，促进纺锤体的形成。

MPF 还可促进中期细胞向后期的转换。中期染色体两姐妹染色单体的分离是启动后期的关键。在中期姐妹染色单体着丝粒间由一种被称为黏着蛋白（cohesin）的，主要由 Scc1 与 Smc 两类蛋白构成的复合体相连，该复合体连接活性受控于 securin 蛋白（图 13-16）。后期之前 securin 与分离酶（separase）结合，使该酶活性被抑制。在中期较晚的阶段，一旦所有染色体的动粒均与纺锤体微管相连，APC 可在 MPF 作用下发生磷酸化，进而与 Cdc20 结合而被激活，随后将引起 securin 发生多聚泛素化反应，最终被降解，分离酶由此被释放、活化，在其作用下，cohesin 复合体中 Scc1 被分解，姐妹染色单体的着丝粒发生分离，在纺锤体微管的牵引下，分别移向两极，细胞进入后期阶段。



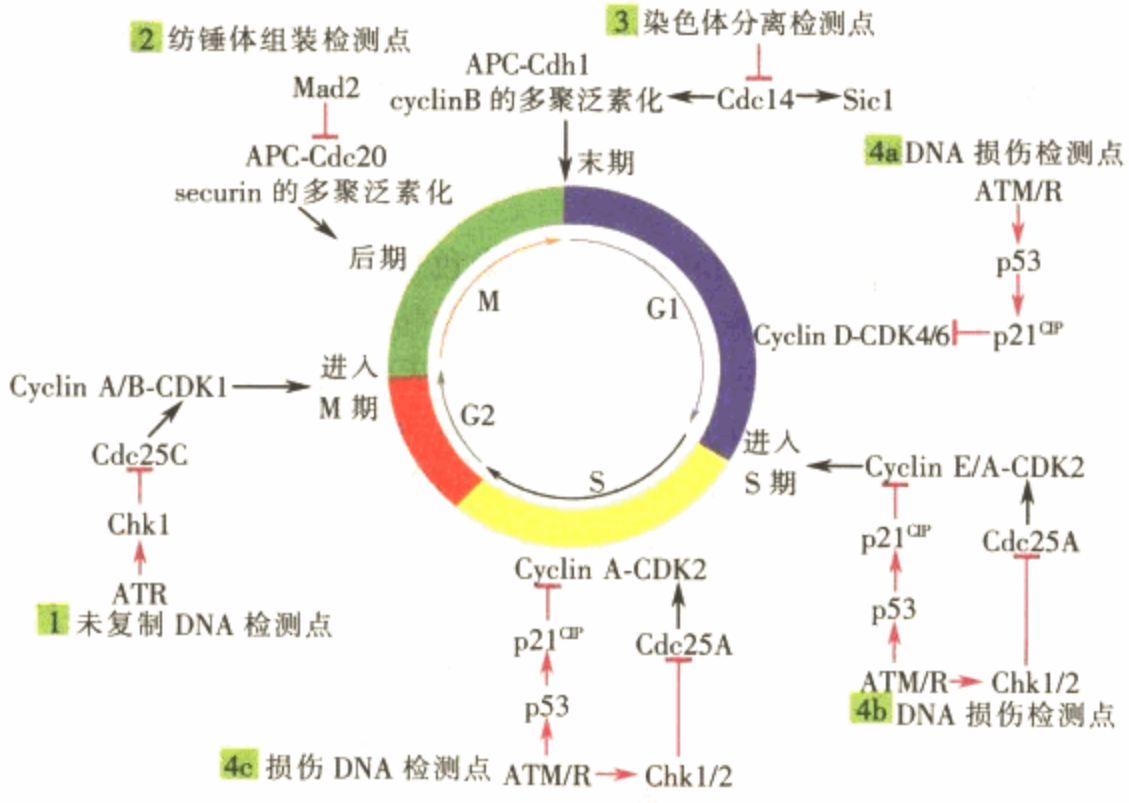
●图 13-16　APC 的激活与染色单体的分离

在有丝分裂后期末，cyclinB 在激活的 APC 作用下，经多聚泛素化途径被降解，MPF 解聚、失活，促使细胞转向末期，此时细胞中因失去了 MPF 的活性作用，磷酸化的组蛋白、核纤层蛋白等可在磷酸酶作用下发生去磷酸化，染色体又重新开始去凝集、核膜也再次组装，子代细胞核逐渐形成。后期末 MPF 激酶活性降低，也促进了胞质分裂发生。在 M 期早期，MPF 可对参与胞质分裂收缩环形成的肌球蛋白进行磷酸化，随着后期 MPF 的失活，磷酸酶使肌球蛋白去磷酸化，其活性恢复，与肌动蛋白相互作用使收缩环不断缢缩、分裂沟不断加深直至细胞质发生分裂。

（二）细胞周期检测点监控细胞周期的运行

在细胞周期的进程中，如果某一阶段的重要活动尚未结束或发生错误尚未修复，细胞

就进入下一个阶段，生物的遗传特性将受到灾难性的损害，例如产生早熟染色体或导致染色体数目异常。为了保证细胞染色体数目的完整性及细胞周期正常运转，细胞中存在着一系列监控系统，可对细胞周期发生的重要事件及出现的故障加以检测，只有当这些事件完成或故障修复后，才允许细胞周期进一步运行，该监控系统即为检测点（checkpoint），包括未复制-DNA 检测点、纺锤体组装检测点、染色体分离检测点及 DNA 损伤检测点（图 13-17）。检测点对细胞周期的调节机制与细胞内由多种蛋白质、酶及 cyclin-Cdk 复合物等组成的生化路径相关。



●图 13-17　细胞周期的检测点

1. 未复制 DNA 检测点　在正常的细胞周期中，DNA 未发生复制时，细胞不能进入有丝分裂。未复制 DNA 检测点的作用主要包括识别未复制 DNA 并抑制 MPF 激活。在裂殖酵母与爪蟾卵细胞提取物中，有两种蛋白激酶在未复制 DNA 检测点有重要的功能，即 ATR 与 Chk1，它们能阻止未经 DNA 复制的细胞发生分裂。

在 DNA 复制进行过程中，ATR 在与 DNA 复制叉结合后被激活，由此引起一系列蛋白激酶级联反应，即：ATR 磷酸化激活 Chk1 激酶，Chk1 再磷酸化 Cdc25 磷酸酶，使其不能去除 M 期 Cdk 上抑制其活性的磷酸基，cyclinA/B-Cdk1 复合物保持被抑制状态，不能磷酸化启动 M 期的靶蛋白。上述活动可持续发生，直至所有复制叉上 DNA 合成全部完成，复制叉解体，由此使得 M 期必须在 DNA 合成结束后才能发生。

2. 纺锤体组装检测点　该检测点的作用主要是阻止纺锤体装配不完全或发生错误的中期细胞进入后期，即使细胞中仅有一个染色单体上的动粒未与纺锤体微管正确相连，后期也不能发生。

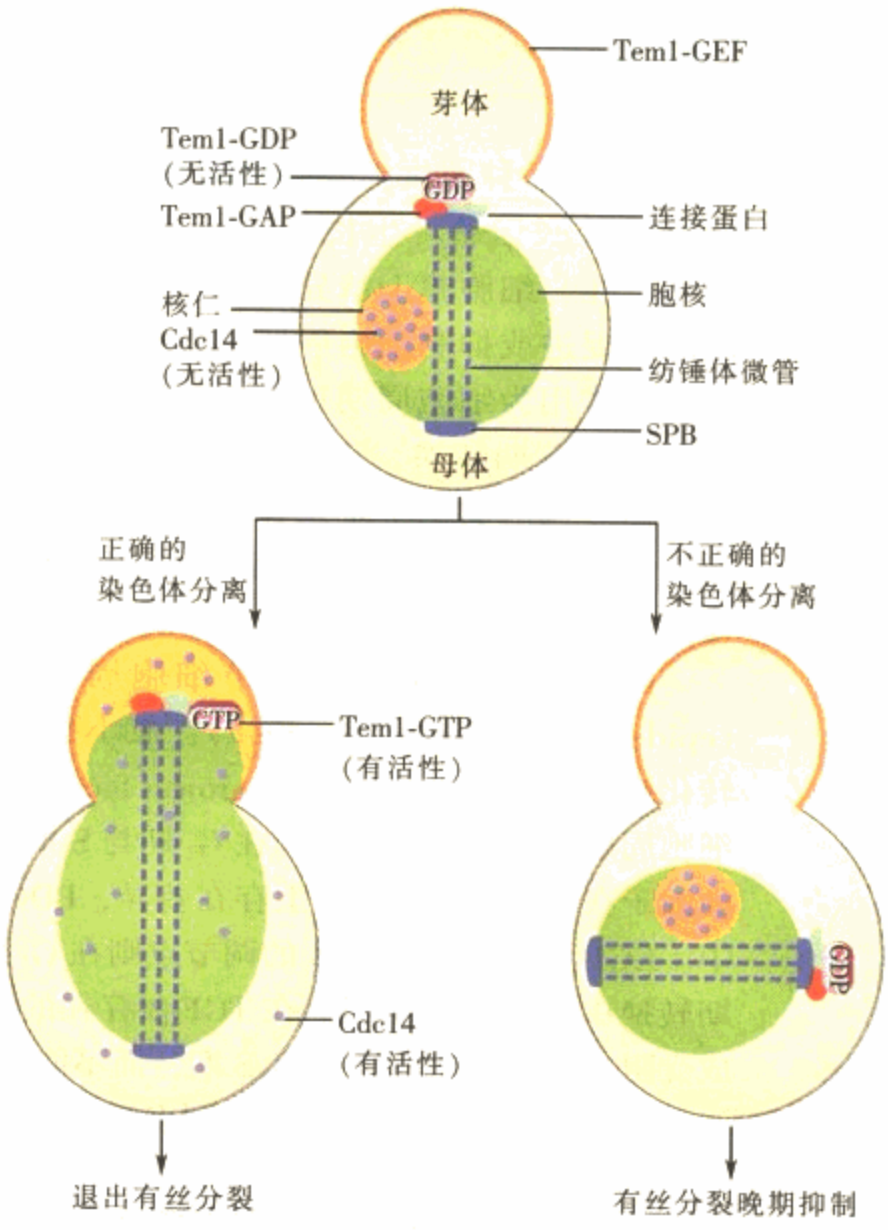
对酵母纺锤体组装检测点突变体的研究证实，Mad2 是纺锤体组装检测点作用机制中关键的蛋白质。在细胞周期进程中，APC 所介导的 securin 蛋白的多聚泛素化控制着中期向后期的转化，Mad2 对 APC 的激活因子 Cdc20 有抑制作用。在中期染色体上，若有某一动粒未与纺锤体微管相连接，Mad2 将结合于该动粒上并短暂激活，与 Cdc20 附着使其失活，APC 活化及 securin 蛋白的多聚泛素化受阻，染色单体着丝粒间不能分离，由此阻止了细胞进入后期。一旦染色体上所有的动粒均被动粒微管附着，纺锤体组装完成，Mad2 与动粒的结合停止，恢复其无活性状态，Cdc20 活性抑制状态被解除，

引起 APC 相继活化及 securin 蛋白的多聚泛素化，启动染色单体的分离及细胞向后期的转化。

3. 染色体分离检测点　在细胞周期进程中，末期发生的各种事件及随后的胞质分裂，均需要 MPF 的失活。Cdc14 磷酸酶的活化，能促使 M 期 cyclin 经多聚泛素化途径被降解，导致 MPF 活性的丧失，引发细胞转向末期。

染色体分离检测点是通过监测发生分离的子代染色体在后期末细胞中的位置，来决定细胞中是否产生活化的 Cdc14 磷酸酶，以促进细胞进入末期，发生胞质分裂，最后退出 M 期。该检测点的存在阻止了在子代染色体未正确分离前末期及胞质分裂的发生，保证了子代细胞含有一套完整的染色体。

在芽生酵母中，染色体分离检测点的作用机制依赖于由多种蛋白质组成的“有丝分裂退出系统”。在这类酵母细胞中，无活性的 Cdc14 磷酸酶存在于核仁内，受控于一小的 GTP 酶 Tem1。在细胞分裂后期，无活性的并与 GDP 结合的 Tem1 与纺锤体靠近子代细胞芽的极体（相当于高等真核细胞的中心体）相连。若后期末随着纺锤体微管的增长，相互分离的子代染色体被正确定位，Tem1 则会位移至子代细胞芽中，与存在于子代细胞芽中的 GEF 蛋白作用，活化为 GTP 结合状态，通过激活某些蛋白激酶，使核仁中与 Cdc14 结合并抑制其活性的蛋白质磷酸化，Cdc14 活性恢复，并从核仁中释放，经活化 APC 特异性因子 Cdh1，使 cyclinB 发生多聚泛素化，进而被降解，MPF 失活，细胞开始进入末期。如果后期末子代染色体分离方向出现异常，未能进入细胞芽中，此时 Tem1 因不能与 GEF 蛋白接触，将保持其非活化状态，Cdc14 就不会从核仁中释放，细胞向末期的转变受阻，不能退出有丝分裂（图 13-18）。



● 图 13-18　芽生酵母中 Cdc14 活性与染色体分离检测点的关系

4. DNA 损伤检测点　在细胞周期过程中，DNA 可能因外界化学及物理因素的影响而被损伤，此时，DNA 损伤检测点将阻止细胞周期继续进行，直到 DNA 损伤被修复。如果细胞周期被阻在 G_1 或 S 期，受损的碱基将不能被复制，由此可避免基因组产生突变以及染色体结构的重排。若细胞周期被阻在 G_2 期，可使 DNA 双链断片得以在细胞进行有丝分裂以前被修复。

在 DNA 损伤检测点，有三种肿瘤抑制蛋白起着关键的作用，它们是 ATM/ATR、ChK1/2 及 p53。当 DNA 因紫外线或射线的作用出现损伤时，DNA 损伤检测点将被激活，在活化蛋白激酶 Chk2 后，可使磷酸酶 Cdc25 磷酸化，Cdc25 最终经多聚泛素化标记后发生降解。在哺乳动物中，Cdc25 的磷酸酶作用为 Cdk2 完全活化所必需，Cdc25 失活将导致 Cdk2 不能活化，由 cyclinE/A-Cdk2 介导的跨越 G_1 期或 S 期的进程将不能发生，细胞因此被滞留于 G_1 或 S 期。活化的 ATM/ATR 也能通过磷酸化作用，稳定原本在细胞中极不稳定的 p53 蛋白，使其对某些特异性基因转录的促进能力增强，其中包括编码 $p21^{Cip}$ 的基

因，由此产生的 $p21^{Cip}$ 可将哺乳动物所有的 cyclin-Cdk 的活性抑制，进一步使细胞在DNA修复完成以前，被阻留在 G_1 或 G_2 期。

以上四种细胞周期检测点的特点及作用机制总结见表 13-4。

表 13-4　细胞周期检测点的特点及作用机制

检测点类型	作　用　特　点	与作用相关的主要蛋白质
未复制 DNA 检测点	监控 DNA 复制，决定细胞是否进入 M 期	ATR、Chl1、Cdc25、cyclinA/B-Cdk1
纺锤体组装检测点	监控纺锤体组装，决定细胞是否进入后期	Mad2、APC、securin
染色体分离检测点	监控后期末子代染色体在细胞中的位置，决定细胞是否进入末期及发生胞质分裂	Tem1、Cdc14、M 期 cyclin
DNA 损伤检测点	监控 DNA 损伤的修复，决定细胞周期是否继续进行	ATM/ATR、ChK1/2、p53、Cdc25、cyclinE/A-Cdk2

（三）多种因素与细胞周期调控密切相关

1. 生长因子　生长因子（growth factor）是一类由细胞自分泌或旁分泌产生的多肽类物质，在与细胞膜上特异性受体结合后，经信号转换及多级传递，可激活细胞内多种蛋白激酶，促进或抑制细胞周期进程相关的蛋白质表达，由此可参与对细胞周期的调节。生长因子的作用为细胞周期正常进程所必需。处于 G_1 期早期的细胞，若缺乏生长因子的刺激，将不能向 S 期转换，进而脱离细胞周期，进入静止状态，成为 G_0 期细胞。细胞周期被细胞外信号调节的例子是生长因子对动物细胞增殖的效应。此外，在细胞周期进程中，细胞周期的不同阶段，例如细胞生长、DNA 复制和有丝分裂期相互间必须是协同的，这均有赖于生长因子的调节。

能影响细胞增殖及调节细胞周期的生长因子有多种，常见的如：表皮生长因子（epidermal growth factor，EGF）、血小板源生长因子（platelet-derived growth factor，PDGF）、转化生长因子（transforming growth factor，TGF）、白介素（interleukin，IL）等，这些因子对细胞周期的主要作用阶段均在 G_1 期与 S 期，可刺激或抑制静止期细胞进入 G_1 期或 S 期。不同的因子在调节的具体时段上存在差异，PDGF 的调节点一般在 G_1 期以前的 G_0 向 G_1 期转变过程中。EGF、IL、TGF-α、β 的调节点则在 G_1 期向 S 期转换过程中。已证实TGF-β 可在 G_1 期向 S 期转换中起负调节作用。在 TGF-β 存在的情况下，cyclinE 表达降低，cyclinE-Cdk2 复合物形成受阻，细胞被迫滞留于 G_1/S 期，而不能向 S 期转换。

一种细胞的细胞周期可受到多种生长因子的调节，而同一种生长因子又可作用于多种类型细胞的增殖过程，并随细胞类型的不同，作用效应也表现出差异。如 TGF-β 对细胞增殖是促进还是抑制，取决于所作用的细胞类型，就大多数类型细胞而言，TGF-β 在细胞周期中具有抑制细胞分裂的作用，而对少数间质来源的细胞，如成骨细胞，TGF-β 却表现为促进细胞分裂。生长因子对细胞周期的调节效应还与生长因子浓度及其与受体的亲和性相关，当生长因子浓度升高或与受体亲和性增强，对细胞周期的调节作用将得到促进。

2. 抑素　抑素（chalone）是一种由细胞自身分泌的，能抑制细胞周期进程的糖蛋白，通常分布于其发挥作用的特异性组织中。抑素主要在 G_1 期末及 G_2 期对细胞周期产生调节作用，在 G_1 期发挥作用的抑素通常被称为 S 因子，能阻止 G_1 期细胞进入 S 期。在 S 期起作用的抑素又称为 M 因子，能抑制 S 期细胞向 M 期的转变。

抑素可通过与细胞膜上特异性受体结合，引起信号的转换及向胞内的传递，进而对细胞周期相关蛋白的表达产生影响，这种调节方式与生长因子的作用极其类似。抑素对细胞周期的作用具有无毒及可逆的特点，并表现出较强的细胞系特异性，可随细胞类型不同而有所差异，

如红细胞、淋巴细胞、肝细胞、表皮细胞等均存在其特异性的抑素。

3. cAMP 与 cGMP　cAMP 与 cGMP 均为细胞信号转导过程中重要的胞内信使，在细胞周期中，两者可相互拮抗，控制细胞周期的进程。cGMP 能促进细胞分裂中 DNA 及组蛋白的合成，cAMP 对细胞分裂有负调控作用，其含量降低时，细胞 DNA 合成及细胞分裂将加速。细胞中 cAMP 与 cGMP 两者数量的平衡，是维持正常细胞周期进程的一个重要因素，cGMP 浓度的升高常发生于一些恶性肿瘤的细胞中。

4. RNA 剪接因子 SR 蛋白及 SR 蛋白特异的激酶　真核细胞基因在表达为蛋白质前，均需经历一个 RNA 剪接的过程。两种影响 RNA 剪接的因子，即剪接因子 SR 蛋白与 SR 特异激酶（SR protein-specific kinase，SRPK1），已被证实与细胞周期调控相关。

SR 蛋白可通过磷酸化或去磷酸化的方式在 RNA 剪接中起作用，磷酸化的 SR 为 RNA 剪接的起始所必需，而在剪接的过程中，SR 则处于去磷酸化状态。伴随着细胞周期进程，SR 蛋白可发生有规律的磷酸化与去磷酸化。间期中 SR 蛋白磷酸化程度低，在胞核内聚集成核斑。细胞进入 M 期后，SR 磷酸化程度逐渐增高，核斑发生去组装，逐渐分散，到中期则完全消失。

SR 蛋白磷酸化水平受控于其专一激酶 SRPK1，该激酶在细胞周期中活性变化的规律与 SR 蛋白存在一致性。借助于离子交换柱法，可从细胞周期各阶段的细胞提取液中纯化得到 SRPK1，以 SR 蛋白作为底物，可在体外检测该激酶活性。结果显示测得 SRPK1 最高活性出现于中期，超出间期细胞 3~5 倍。现已证实，中期细胞高活性的 SRPK1 直接作用于 SR 蛋白后，引起其高度磷酸化，通过这一特异性的作用，SRPK1 可发挥其对细胞周期的调控作用。

四、癌基因和抑癌基因在细胞周期调控中的作用

除细胞分裂周期基因（cell division cycle gene，Cdc gene）之外，癌基因（oncogene）家族及抑癌基因（suppression-oncogene）家族在细胞周期调控中具有重要的作用，它们的产物通过与生长因子受体结合或直接作用于某些 *Cdc* 基因，促进或抑制细胞增殖，为细胞周期运行所必需，当其发生突变或失活时，将导致细胞的异常增殖及癌变。

（一）癌基因家族通过多种产物对细胞周期进行调节

病毒癌基因（V-oncogene，V-onc）是指一些逆转录病毒基因组所具有的，异常活化后可使细胞无限增殖进而癌变的 DNA 序列。在脊椎动物正常细胞中，与 V-onc 相似的同源 DNA 序列被称为细胞癌基因（cellular oncogene，C-onc）或原癌基因（proto-oncogene）。原癌基因是一种显性基因，在正常情况下表达较少，但却为细胞生长、增殖所必需。原癌基因突变或过度表达，将导致细胞增殖发生异常，引起癌变。癌基因及原癌基因包括 *src*、*ras*、*sis*、*myc*、*myb* 等基因家族成员，其产物种类较多，主要可分为生长因子类蛋白、生长因子受体类蛋白与细胞内信号转导相关的蛋白及转录因子类蛋白。例如，*sis* 基因为编码生长因子类癌蛋白的主要基因，其产物在结构上能模拟生长因子，同其相应的受体结合，以自分泌的方式刺激细胞分裂、生长，对细胞周期进行调控；编码产物为生长因子受体的癌基因及原癌基因包括 *V-erb-B*、*c-fms*、*trk* 等，它们的产物在与生长因子结合后，可参与并介导生长因子对细胞周期的调节；编码与细胞内信号传递相关癌蛋白的癌基因及原癌基因种类较多，其中 *raf*、*mos* 等基因产物为具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性的蛋白，多分布于胞质中，通过丝氨酸/苏氨酸激酶级联反应，参与信号的转导；能编码转录因子类癌蛋白的癌基因与原癌基因有 *c-jun*、*c-fos*、*c-myc* 等，其产物分布于细胞核内，为 DNA 结合蛋白，可参与基因转录的调节过程。这样，通过不同的编码产物，癌基因与原癌基因能以多种方式参与对细胞周期的调节。

（二）抑癌基因从转录水平影响细胞周期

抑癌基因（anti oncogene）为正常细胞所具有的、能抑制细胞恶性增殖的一类基因。这类基因编码的蛋白质通常能与转录因子结合或本身即为转录因子，可作为负调控因子，影响细胞周期相关蛋白的合成及 DNA 复制，进而调节细胞周期的进程。抑癌基因属隐性基因，在正常的二倍体细胞中，当其两个等位基因同时发生缺失或失活，将导致细胞增殖失控、发生癌变。

迄今已有十几种抑癌基因被分离、鉴定，其中 *Rb* 及 *p53* 的作用机制研究较为深入。

Rb，又称遗传性视网膜母细胞瘤（Retinoblastoma）基因，其产物为一种分布于胞核的，分子量为 105 000 的蛋白质。Rb 蛋白可在丝氨酸/苏氨酸残基发生磷酸化，该磷酸化与依赖于细胞周期蛋白的激酶，如 cyclinD/E-Cdk4/6 等的作用有关，并呈现出细胞周期依赖性，即：早 G_1 期磷酸化水平较低，到晚 G_1 期逐渐升高，G_2 期、S 期时，磷酸化程度达到最高，M 期结束之后，则又回复到低磷酸化水平。

在细胞周期中，pRb 可通过改变其磷酸化状态，控制与其结合的转录因子活性，进而影响细胞周期相关蛋白基因的表达。在 Rb 蛋白去磷酸化时，与其结合的转录因子不能与靶基因结合、活性被抑制，不能促进基因的表达。当 Rb 蛋白发生磷酸化后，转录因子与其分离、活性恢复，与靶基因结合后，可刺激其表达。

在细胞周期过程中，pRb 与转录因子 E2F 间的相互作用对 G_1 期向 S 期的转换有重要调节作用。在 G_1 早期，去磷酸化的 Rb 蛋白与转录因子 E2F 结合，使 E2F 活性缺乏，S 期所需的基因转录受阻。到 G_1 期末，随着 cyclin-Cdk 将 Rb 蛋白磷酸化，E2F 被逐渐释放、活化，解除了 S 期所需基因的转录阻断，细胞由 G_1 期向 S 期转换。

p53 基因产物的分子量为 53 000，分布于胞核。该蛋白因其半衰期短，在细胞中稳定性较差。p53 蛋白可作为转录因子或与其他转录因子结合，在细胞周期进程中，直接或间接影响细胞周期相关基因的转录，使细胞滞留于 G_1 期。p53 蛋白的作用是通过促进 *WAF1/CIP1* 基因转录来实现的。*WAF1/CIP1* 基因产物 p21 为一种 CKI，其产生后可抑制 Cdk 的活性，使 pRb 蛋白磷酸化受阻，与 S 期相关的转录因子 E2F 不能被释放，DNA 复制不能进行，细胞无法从 G_1 期进入 S 期。

p53 基因也可在细胞周期 DNA 损伤检测点发挥其调节作用。当细胞在 X 射线照射下，其 DNA 出现断裂等损伤时，p53 蛋白磷酸化程度将增高，并由此变得更为稳定，降解减慢，细胞中 p53 蛋白的表达量迅速上升，受其促进，*WAF1/CIP1* 基因的转录被激活，pRb 蛋白磷酸化受抑制，细胞周期将由此停滞于 G_1 期，p53 蛋白的这一作用为细胞有足够时间来完成 DNA 修复提供了保证。

五、卵母细胞减数分裂及其调控

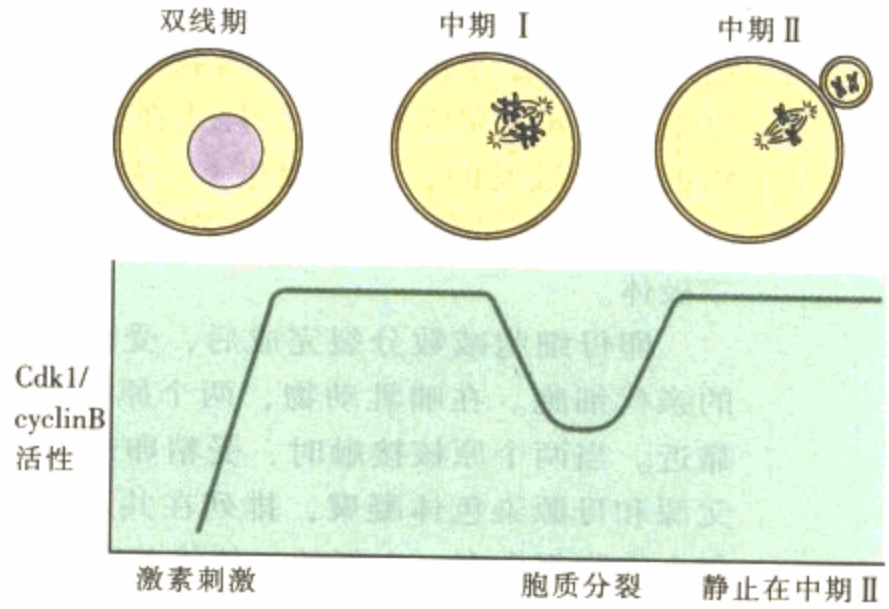
脊椎动物的卵母细胞（oocyte）为发育中的卵细胞，其体积较大，易于进行实验操作，因此是细胞周期调控研究的一个良好的模型，例如，MPF（Cdk1/cyclin B）的发现和纯化就是在非洲爪蟾卵母细胞中完成的。而且，与其他物种一样，蛙卵母细胞的减数分裂也在细胞周期的两个特殊位点被调控，即在第一次减数分裂双线期和第二次减数分裂中期。因此，对卵母细胞减数分裂的深入研究有利于阐明细胞周期调控的机制。

卵母细胞减数分裂的第一个调控位点在第一次减数分裂双线期。卵母细胞可以在该期停留很长时间（在人类可以达到 50 年），其间染色体去凝聚并进行活跃的转录，转录活性升高可表现为卵母细胞体积明显增大。例如，人卵母细胞在这一时期的直径可达到 100μm，蛙卵母细胞直径甚至接近 1mm。此期中，细胞生长的同时，卵母细胞蓄积大量

RNA 和蛋白质等支持胚胎早期发育所需要的物质。当早期胚胎的细胞周期发生后，细胞不再长大，受精卵快速分裂成为体积较小的细胞。

不同物种的卵母细胞重新进入减数分裂和受精的发生过程是不同的。某些动物的卵母细胞在受精前一直停留在双线期，在受精后才完成减数分裂。但是，大多数脊椎动物（包括蛙、鼠和人类）的卵母细胞在受到激素刺激后发生减数分裂的恢复，并在受精前完成第一次减数分裂。第一次减数分裂后的细胞分裂不对称，结果生成了一个小的极体和一个体积不变的大的卵母细胞。接着，卵母细胞在没有重新形成细胞核，染色体也没有去凝聚的情况下进入第二次减数分裂。然后，大多数脊椎动物卵母细胞又会停滞在中期Ⅱ期，并维持在这个时期直到受精。

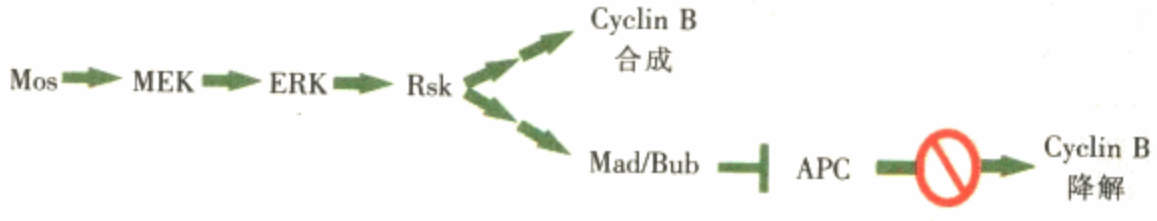
与体细胞的有丝分裂期一样，卵母细胞的减数分裂也是由 Cdk1/cyclin B 复合物的活性调控的。但是，在卵母细胞减数分裂过程中，Cdk1 独特的调控是导致减数分裂从第一次分裂进入第二次分裂并停止在中期Ⅱ的原因（图 13-19）。与体细胞从 G_2 期转换到 M 期一样，通过激活 Cdk1，激素刺激停止在双线期的卵母细胞，触发其减数分裂恢复。然后，与有丝分裂一样，Cdk1 诱导染色体凝聚、核膜崩解以及纺锤体形成。之后，随着活化的 Cdk1 的减少，活化的后期促进复合物使卵母细胞从第一次减数分裂的中期转入后期，伴有 Cdk1 活性下降。但是，与有丝分裂不同的是，Cdk1 的活性只是部分减弱，所以，卵母细胞维持在 M 期，染色体保持凝聚状态，不重新形成核膜。胞质分裂后，Cdk1 的活性又升高，并在卵细胞停滞于中期Ⅱ时保持其高活性状态。这种调控机制是卵母细胞独有的，即在第一次减数分裂从中期向后期的转换过程以及随后被阻止在中期Ⅱ的阶段，保持Cdk1 的活性避免了如在正常 M 期时由 cyclin B 蛋白水解引起的 Cdk1 失活。



● 图 13-19　卵细胞减数分裂中 Cdk1/cyclinB 的活性

1971 年，Y. Masui 和 C. L. Markert 在与发现 MPF 相同的系列实验中首次鉴定出造成中期Ⅱ停止的因子。他们将阻止在中期Ⅱ的卵细胞胞质注射到正经历有丝分裂细胞周期的早期胚胎细胞中，结果卵细胞胞质注射引起胚胎细胞停止在中期，这表明，中期阻止是由存在于卵细胞中的某种胞质因子引起的。因为这种因子能引起有丝分裂停止，所以被称作细胞静止因子（cytostatic factor，CSF）。

近来，更多的实验已经鉴定出 CSF 的基本成分是一种丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶（Mos）。Mos 在卵母细胞第一次减数分裂完成前后恰好合成，以供卵母细胞从中期Ⅰ转换到后期Ⅰ，并使卵母细胞停滞于中期Ⅱ阶段，保持 Cdk1/cyclin B 复合物的活性之需。Mos 活化ERK（MAP 激酶），ERK 在细胞信号通路中起着重要作用。但是，此时卵母细胞中 ERK 起着不同的作用：它激活一种叫作 Rsk 的蛋白激酶，Rsk 通过激活 cyclin B 复合物以及抑制 cyclin B 的降解而维持 MPF 的活性（图 13-20）。Mad/Bub 蛋白通过抑制后期促进复合物



● 图 13-20　Cdk1/cyclinB 的活性通过 Mos 蛋白激酶维持

（APC），间接抑制 cyclin B 降解。这与纺锤体组装检测点的阻止非常相似。因此，Mos 在卵母细胞减数分裂期通过维持 Cdk1/cyclin B 的活性而使卵母细胞停止在中期Ⅱ。卵母细胞能维持在减数分裂周期的这一时期数天，直至受精。

受精时，精子结合到卵细胞表面的受体上，并与卵细胞的质膜融合，一个含有两个亲代细胞遗传信息的新的二倍体生物个体开始发育。受精不仅导致了父源和母源染色体的混合，而且诱导了卵细胞胞质的许多改变，这些改变对进一步发育非常关键。卵细胞的这些变化导致卵母细胞完成减数分裂，并开始早期胚胎的有丝分裂细胞周期。

卵细胞胞质中 Ca^{2+}浓度升高是精子与卵细胞质膜上的受体发生结合的关键信号，而 Ca^{2+}浓度升高可能是由 4,5-磷酸酯酰肌醇（PIP_2）水解刺激引起的。细胞内高浓度的Ca^{2+}的作用之一是诱导卵细胞质膜的表面发生改变，阻止另外的精子进入卵细胞。由于通常卵细胞处于大量精子的包围之中，所以这是确保形成正常二倍体胚胎的关键事件。Ca^{2+}介导大量存在于卵母细胞质膜下的分泌小泡外排，这导致卵母细胞膜表面发生改变。为了阻止多精入卵，分泌小泡释放出内含物改变卵细胞的细胞外衣。受精后细胞溶质的 Ca^{2+}浓度升高也是减数分裂完成的信号。停止在中期Ⅱ的卵细胞从中期向后期的转换是由后期促进复合物的激活触发的，后期促进复合物被 Ca^{2+}依赖的磷酸化作用和抑制蛋白的降解所激活。Cyclin B 降解的结果导致第二次减数分裂完成，并通过不对称的胞质分裂排出一个小的第二极体。

卵母细胞减数分裂完成后，受精卵含有两个单倍体核（称作原核）。原核来源于各自的亲代细胞。在哺乳动物，两个原核随后进入 S 期复制其 DNA，与此同时两个原核相互靠近。当两个原核接触时，受精卵进入第一次有丝分裂的 M 期。两个细胞核的核膜崩解，父源和母源染色体凝聚，排列在共同的纺锤体上。有丝分裂完成后将产生两个胚胎细胞，每个细胞都含有一个新的二倍体基因组。随后，这些细胞开始一系列的胚胎细胞分裂，最终发育成为一个新的生命个体。

经典实验：MPF 的发现

研究背景

20 世纪 60 年代进行的核移植与细胞融合实验揭示，若将细胞核转移至处于有丝分裂不同阶段的细胞中，该细胞核会逐渐适应宿主细胞的行为，这说明细胞核的有丝分裂活性是由细胞质调节的。然而，虽然当时已经推测细胞中存在着能调节细胞核有丝分裂活性的胞质因子，但并没有办法用直接的实验加以证实。直到 20 世纪 70 年代，Masui 与 Markert 通过研究非洲爪蟾卵母细胞减数分裂时胞质因子对细胞核行为的调节作用，才确认了这类胞质因子的存在。

前有实验已经表明，爪蟾卵母细胞的减数分裂阻滞在 G_2 期，用激素黄体酮处理此期的爪蟾卵母细胞，可触发减数分裂的恢复，此过程相当于体细胞从 G_2 期向 M 期转换。随后，卵母细胞继续发育并阻滞在第二次减数分裂中期直至受精。于是 Masui 与 Markert 猜测，黄体酮和受精在减数分裂过程中的效应均是因为细胞质发生了变化，这些胞质的变化调节了细胞核的活性。实验中，他们通过将激素刺激后的卵母细胞的细胞质转移到未经刺激的卵母细胞中，直接证实了这个假说。实验证明，经激素处理后卵母细胞中的一种胞质因子可诱导卵母细胞减数分裂的初始，Masui 与 Markert 将其命名为成熟促进因子（MPF）。

实验内容

由于爪蟾卵母细胞体积大并且在经过玻璃微量吸管注射后依然能够存活，因此是测

验胞质因子活性独特的、良好的实验体系。Masui 和 Markert 实验的基本步骤是：从经黄体酮处理恢复减数分裂的供体卵母细胞中移出胞质，将其分为不同的分量后分别注入未处理过的受体卵母细胞中，以促使其恢复减数分裂。实验得到的关键结果是：供体卵母细胞经黄体酮处理 6 小时或更长时间后，移出的胞质注入受体卵母细胞中能诱导后者减数分裂恢复；而从未经黄体酮处理的对照组卵母细胞中移出的胞质，则对受体卵母细胞没有影响。由此可见，经黄体酮处理的卵母细胞中含有一种胞质因子，能诱导未经黄体酮处理的受体卵母细胞恢复减数分裂。

对照实验，特别是证明了将黄体酮直接注入受体卵母细胞中不能诱导减数分裂的实验，排除了黄体酮本身是供体胞质中的减数分裂诱导因子的可能性。黄体酮只在细胞外起作用，说明黄体酮作用于细胞表面受体，进而激活了胞质内的一种特殊因子。由 D. smith 和 R. Ecker 独立进行的类似实验也得出了相同的结论。

有趣的是，在这个实验中黄体酮对卵母细胞的作用方式与对其他大多数细胞的作用方式截然不同。对于大多数细胞，黄体酮是透过细胞膜并与胞内受体结合；但在卵母细胞中，黄体酮很明显是通过作用于细胞表面来激活一种存在于卵母细胞胞质内的特殊因子的。由于卵母细胞减数分裂的恢复通常又称为卵母细胞成熟，所以 Masui 和 Markert 将他们新发现的这种减数分裂调节因子命名为“成熟促进因子”。

发表论文

Yoshio Masui and Clement L.Markert（Yale University，New Haven，USA）：

Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes.J.Exp. Zool.1971，177：129-146.

后续影响

在非洲爪蟾卵母细胞中发现 MPF 后，人们在体细胞中也发现了 MPF。在体细胞有丝分裂过程中，MPF 诱导细胞从 G_2 期向 M 期转换。因此，MPF 似乎是使有丝分裂和减数分裂进入 M 期的共同调节剂。1988 年研究者们终于从非洲爪蟾卵母细胞中纯化出 MPF，并结合酵母遗传学以及对海胆胚胎的研究，鉴别出了这种关键的细胞周期调节剂。也就是说，研究发现 MPF 是由周期蛋白 B 和 Cdk1 蛋白激酶组成的二聚体复合物。进一步的研究确定，周期蛋白 B 和 Cdk1 分别为两类蛋白质大家族中的成员，这两类蛋白质大家族包含了不同的周期蛋白和 Cdk1 相关蛋白激酶，它们在调节细胞周期的其他转换时起类似于MPF 的作用。

MPF 在蛙卵母细胞中的发现促使人们了解到一种保守存在于所有真核生物中细胞周期的调控元件。

第三节　细胞周期与医学的关系

一、细胞周期与组织再生

机体不断地产生新细胞，以补充因生理或病理原因死亡的细胞，这一过程即为组织再生，可分为生理性再生及补偿性再生两类。细胞分裂、增殖是组织再生的基础。

生理性再生常见于正常人体的骨髓、皮肤表皮和肠上皮等组织中，当一些高度分化的细胞逐渐进入衰老死亡的同时，新的细胞也在不断地产生，以此维持组织细胞数量的恒定，同时使组织处于不断更新的状态。生理性再生的形成与干细胞的分裂直接相关。

在自我更新组织的某些特定部位，如表皮基底层、皮肤毛囊隆突部、小肠上皮隐窝底部等，均存在一些未分化、分裂缓慢的细胞，即干细胞（stem cell），其一部分子代细胞保留了亲代细胞继续分裂的潜能，另一部分则可向多个方向分化。干细胞这种既能自我更新，又具多向分化潜能的特点，在细胞数量及种类上为组织更新提供了保证，构成了生理性再生的基础。如造血干细胞在骨髓细胞所占比例仅占为 0.25%，但一个造血干细胞每天分裂后，经分化可形成 12 种结构与功能不同的血细胞，其中，仅外周血红细胞数量就可达 200 000 个，粒细胞的数量则在 1 000 个左右。

补偿性再生是指机体一些高度分化，一般不发生增殖的组织如肝、肾、骨骼等，在受到外界损伤后可重新开始分裂的现象。大鼠肝组织在切除了 2/3 结构后，发生分裂的细胞数明显增加，有丝分裂指数从 0.02%上升至 3.6%，增高近 200 倍。与此同时，其细胞周期时间由原来的 47.5 小时减少为 15 小时。补偿性再生形成的机制被认为是损伤刺激了原处于 G_0 期的细胞，使其重新进入了细胞周期进程，恢复细胞分裂，同时细胞周期的进程也加快，所需时间显著缩短，于是在短时期内可产生大量的新生细胞，以促进创伤后组织的修复。对两栖动物蝾螈肢体再生的研究进一步发现，高度分化的细胞重新进入细胞周期与 Rb 蛋白的作用密切相关。在外界损伤发生后，胞外的信号可经过信号转导系统传递到胞内，活化 cyclin-Cdk 激酶活性，引起 Rb 蛋白的磷酸化，与 Rb 蛋白结合的转录因子被释放、活性恢复，细胞分裂相关的基因转录被激活，其产物促进细胞进入细胞周期。

在补偿性再生中，能促使分化细胞重新分裂、增殖的胞外信号分子主要为一些细胞因子、生长因子等，常见有 EGF、IL-2、bFGF 等。在临床上，可将这些因子相关的生物制剂用于促进创伤组织的修复、愈合治疗中，如角膜移植和外科手术后，常用 EGF 来促进伤口的愈合，而成纤维生长因子则可用于慢性软组织溃疡的治疗中。

二、细胞周期与肿瘤发生

肿瘤是生物体正常组织细胞过度增殖后形成的赘生物，其产生与细胞周期调控发生异常相关。了解肿瘤细胞周期的特点，研究其形成的机制，对于临床上肿瘤的诊断及治疗有重要的意义。

（一）肿瘤细胞的 G_1 期通常较长

1. 肿瘤细胞周期的特点　肿瘤的细胞周期也由 G_1、S、G_2、M 期构成，其细胞周期时间与正常细胞相近或更长一些，此变化主要与肿瘤细胞 G_1 期变长有关。

肿瘤细胞群体中包括了三类细胞周期行为不同的细胞。

（1）增殖型细胞：这是肿瘤中能不断进行分裂，连续进入细胞周期的一类细胞，可直接引起肿瘤的增长。增殖型细胞在肿瘤中所占的数量比例将决定肿瘤恶性的程度。

（2）暂不增殖型细胞：主要为一些具有潜在分裂能力的 G_0 期细胞，其代谢不活跃，不会直接影响肿瘤的生长，但可因外界某些环境因素的刺激，重新进入细胞周期，发生分裂、增殖，因此这类细胞是肿瘤复发的根源。

（3）不增殖型细胞：为一些已经脱离了细胞周期、永远不能进行分裂的分化细胞，其数量的增多，对肿瘤增长无影响。因其将逐渐发生衰老、死亡，因此能降低肿瘤的恶性程度。

肿瘤细胞总量中增殖型细胞所占的比例称为增殖比率，公式表示如下：

$$GF=\frac{A}{A+B+C}$$

A：增殖型细胞　B：暂不增殖型细胞　C：不增殖型细胞

肿瘤的生长快慢与细胞增殖比率、细胞周期的长短以及细胞丢失、死亡的速率等相关，其中，高增殖比率是引起肿瘤快速生长的主要原因，因为与正常细胞相比，绝大多数肿瘤细胞虽然增殖时间较长，但因处于 G_0 期细胞极少，因此有更多的细胞可进入细胞周期、发生分裂，引起肿瘤的快速增长（表 13-5）。

表 13-5　人正常细胞与肿瘤细胞周期时间的比较

正常细胞	周期时间(小时)	肿瘤细胞	周期时间(小时)
食道上皮	144	食管癌	250.8
胃上皮	66	胃癌	80
结肠上皮	24～28	结肠癌	22～125
骨髓细胞	24～40	急性白血病	48～96

肿瘤类型不同，其增殖比率可存在差异，白血病、绒癌等增殖比率常在 0.6 以上，为快速增长的肿瘤。增殖比率在 0.5 以下的肿瘤大多生长相对缓慢，像肺癌、乳腺癌、肝癌等。同一种肿瘤可因生长时期不同，其增殖比率值将有所变化，一般早期比晚期更高。

2. 肿瘤细胞周期调控出现诸多异常　除高增殖比率外，肿瘤形成的另一主要原因是其细胞可以进行无限制的分裂，肿瘤细胞周期中某些重要调节因子发生异常，正负调节因子间作用失去平衡是导致肿瘤增殖无限性的又一重要原因。

TGF-β 是正常细胞周期的负调控因子，与受体结合，进而活化转录因子 SMAD，TGF-β 能促进 *p16*^{INK4} 基因的表达，抑制 G_1 期向 S 期的转换。在人类许多类型的肿瘤中，均存在 TGF-β 受体突变或 SMAD 突变，由此引起的 TGF-β 信号转导通路异常，解除了 TGF-β 对 G_1 期细胞的抑制，促进了细胞增殖。

在肿瘤细胞中，一些能够在 G_1 期限制点发挥作用的蛋白，如 cyclinD1、p16^{INK} 蛋白、Rb 蛋白等常发生表达异常。在某些能够产生抗体的 B 淋巴细胞肿瘤中，*cyclinD1* 易位于抗体基因增强子附近，因此整个细胞周期进程中，*cyclinD1* 均能高度地表达。在人类乳腺癌细胞中，也普遍存在 *cyclinD* 基因的扩增，引起 *cyclinD1* 表达过度。在正常细胞周期 G_1 期末以前，Cdk 抑制物 p16^{INK} 蛋白可通过结合于 cyclinD-Cdk4 复合物上，使 Rb 蛋白磷酸化不能发生、转录因子 E2F 处于未活化状态，由此抑制细胞进入 S 期。在肿瘤细胞中，*p16*^{INK} 基因常发生缺失或因其促进子序列的高度甲基化而失活，导致 p16^{INK} 蛋白对 G_1 期阻止作用解除，细胞增殖发生异常。视网膜母细胞瘤中，*Rb* 基因的两个等位基因均发生突变，使得 Rb 蛋白功能丧失，类似的 *Rb* 基因突变也出现于膀胱、乳腺、肺等癌组织细胞中。

p53 蛋白具有广泛的肿瘤抑制作用，如可促使细胞滞留于 G_1、G_2 期，促进 DNA 损伤后的修复等。现已发现人类约 50%的肿瘤中存在因 *p53* 基因突变导致的 p53 蛋白功能失活。而在恶性肉瘤细胞中，表达正常的 p53 蛋白可因其抑制蛋白 Mdm2 的过度表达，而失去其抑制细胞异常增殖的功能活性。

（二）肿瘤细胞周期特点的研究可能为肿瘤治疗提供新思路

阐明肿瘤细胞周期的特点，可为临床上肿瘤的治疗提供理论依据。

首先应根据肿瘤组织中细胞增殖的情况，确定有效的治疗方法。若肿瘤细胞组成中，暂不增殖型细胞所占比例较高，可针对这些细胞代谢不活跃、对药物及外界因素刺激反应不敏感这些特点，用一些生长因子，如血小板生长因子来激活其潜在的分裂能力，促使其进入细胞周期。然后通过放疗、化疗手段对其加以治疗，可能收到较好效果。若选择手术进行治疗，则应尽量清除残余组织，以避免其复发。

对那些增殖型细胞为主的肿瘤，肿瘤细胞若处于S期，治疗手段则以化疗为主，选择那些能作用于DNA合成中的酶或DNA单链模板活性部位的药物，可抑制DNA合成，阻止肿瘤细胞进入到M期，限制其进一步的生长。若肿瘤细胞处于G_2期，因该期细胞对放射线较为敏感，放疗是主要治疗方法。若在放疗前，用人工方法使G_2期肿瘤细胞发生同步化，放疗效果将更好。对于M期的肿瘤细胞，利用秋水仙素、长春碱等药物使纺锤体微管解聚，由此破坏纺锤体的结构，肿瘤细胞被迫停滞于中期、细胞增殖受阻，因此，对于M期肿瘤细胞，选用化疗的方法较为适合。

化疗是肿瘤治疗中常用的方法。通过选择一定的化学药物，可有效地干扰肿瘤细胞代谢过程，阻止肿瘤细胞增殖。化疗中常用的一些药物总结于表13-6。

表13-6　肿瘤化疗中常用药物在细胞周期中的作用特点

名称	细胞周期中的作用点	作用相关机制
放线菌素D	G_1期、S/G_2期	抑制DNA聚合酶、DNA解旋酶及组蛋白等的合成；也能抑制rRNA的合成
光辉霉素	G_1期	阻止DNA解链，干扰RNA合成
阿糖胞嘧啶	专一作用于S期	抑制三磷酸核苷还原酶，使脱氧核苷酸形成受阻，进而阻止DNA的合成
秋水仙碱	特异性地作用于M期	结合微管蛋白、使纺锤体微管解聚；阻止中期染色体向两极移动，将有丝分裂阻断在中期
氮芥	无特异性作用点	与DNA结合使其分子结构改变

随着对肿瘤细胞周期变化研究的深入，一些新的肿瘤治疗方法，如基因治疗法等已经建立。基因治疗法主要的特点是直接将肿瘤抑制基因注入到肿瘤细胞中，以弥补其细胞中因基因缺陷、异常引起的功能紊乱，使肿瘤快速生长及恶性转化受到遏制。

三、细胞周期与其他医学问题

细胞周期的异常与艾滋病相关。当T细胞受艾滋病病毒感染后，在G_2向M期转化中有重要作用的Cdk1酪氨酸残基将发生过度磷酸化，由此丧失激酶活性，细胞不能向M期转换而滞留于G_2期，最终发生凋亡。

细胞在衰老时，其细胞周期也呈现某些异常的特征，包括细胞分裂速度明显降低，cyclinA、B表达下降，cyclinE不稳定性增加，变得更易被降解，使得Rb蛋白不能被磷酸化，与Rb蛋白结合的转录因子不能发挥其相应的作用，细胞被阻留于G_1期，而不能进入S期，因此，与正常细胞相比，衰老细胞中G_1期可持续更长的时间。

小结

细胞分裂是细胞重要的生命特征之一。细胞分裂不仅是单细胞生物个体繁殖的重要方式，也是多细胞生物组织生长及个体形成的基础。真核细胞中存在有丝分裂、减数分裂及无丝分裂三种方式。

有丝分裂是高等真核生物细胞分裂的主要方式，过程较为复杂，染色质凝集、纺锤体及收缩环的形成是三个重要的特征，而蛋白质磷酸化与去磷酸化，是众多形态变化的分子基础。有丝分裂的结果是遗传物质被平均分配到两个子细胞，由此保证了细胞的遗传稳定性。

减数分裂是发生于配子成熟过程中的一种特殊的有丝分裂，由两次连续的分裂组成，因整个分裂过程中 DNA 只复制一次，所产生的子细胞中染色体数目与亲代细胞相比减少一半，这有利于维持有性生殖的生物上下代遗传的稳定性。第一次减数分裂过程复杂，染色体数目减半及遗传物质的交换等变化均发生于该次分裂中。第二次减数分裂与有丝分裂过程相似。

细胞周期是指细胞从上次分裂结束到下次分裂终了所经历的过程，包括分裂期及间期两个阶段。分裂期细胞形态变化明显，间期细胞中进行着活跃的蛋白质、核酸等物质的合成。根据 DNA 合成的情况，间期可被进一步细分为三个时期，即 G_1 期、S 期及 G_2 期。细胞周期各期主要的动态变化围绕 DNA 复制或细胞分裂展开，S 期为 DNA 合成期，G_1 期处于 S 期与上次分裂期之间，S 期 DNA 复制所需的多种酶与蛋白质在该期合成。G_2 期是S 期与下次分裂期之间的一个时期，为 S 期向 M 期的转变提供条件。

细胞周期进程严格受控于细胞中由多种蛋白构成的复杂调控网络。细胞周期蛋白（cyclin）与细胞周期蛋白依赖激酶（Cdk）是这一调节体系的核心，其他成员还包括生长因子、抑素、cAMP、RNA 剪接因子等。

cyclin 是一类在细胞周期进程中可周期性表达的蛋白质，哺乳动物的 cyclin 包括 cyclinA-H 几大类。Cdk 依赖性激酶为一类必须与细胞周期蛋白结合，才具激酶活性的蛋白激酶。Cdk 的激酶活性需要在 cyclin 及磷酸化双重作用下才能被激活，Cdk 的活性也受到 Cdk 激酶抑制物（CKI）的负性调节。

在细胞周期进程中，不同种类的 cyclin 及 Cdk 之间适时的结合可引发细胞周期进程中特定事件的发生，促成 G_1 期向 S 期，G_2 期向 M 期，中期向后期等关键过程不可逆的转换。G_2 期晚期由 cyclinB-Cdk 形成的复合物，在促进 G_2 期向 M 期转换的过程中起着关键作用，被称为成熟促进因子（MPF）。

检测点能对细胞周期发生的重要事件及出现的故障加以监控，包括未复制-DNA 检测点、纺锤体组装检测点、染色体分离检测点及 DNA 损伤检测点。其作用调节机制与胞内多种蛋白质、酶及 cyclin-Cdk 复合物等组成的生化路径相关。

细胞周期调控的遗传基础涉及编码多种调节蛋白质及酶的基因，其中，癌基因通过其多样的产物对细胞周期进行调节，而抑癌基因可在转录水平上影响细胞周期的进程。

细胞周期与医学关系密切，细胞分裂、增殖构成组织再生的基础，细胞周期的异常可导致肿瘤产生。G_1 期增长、细胞周期中某些重要调节因子发生异常、正负调节因子作用失去平衡可导致肿瘤增殖的无限性。了解肿瘤细胞周期的特点有利于肿瘤的临床治疗，帮助确定有效的治疗方法及指导用药。

（杨　恬）

第十四章　细 胞 分 化

脊椎动物和人类的机体由约 200 多种不同类型的细胞组成，如神经元伸出长的突起，并在末端以突触方式和其他细胞接触，具有传导神经冲动的功能；肌细胞呈梭形，含有肌动蛋白和肌球蛋白，具有收缩功能；红细胞呈双凹面的圆盘状，能够合成携带氧气的血红蛋白；胰岛细胞则合成调节血糖浓度的胰岛素，等等。这些由单个受精卵产生的细胞，在形态结构、生化组成和功能等方面均有明显的差异，将个体发育中形成这种稳定性差异的过程称为细胞分化（cell differentiation）。由一个受精卵来源的细胞为什么会变得如此多样与不同？一直是数百年来许多生命科学家付出毕生精力而至今尚未完全解决的问题。细胞分化是个体发育的核心事件。阐明细胞分化的机制，对于认识个体发育的机制和寻找新的疾病防治措施具有重要意义。

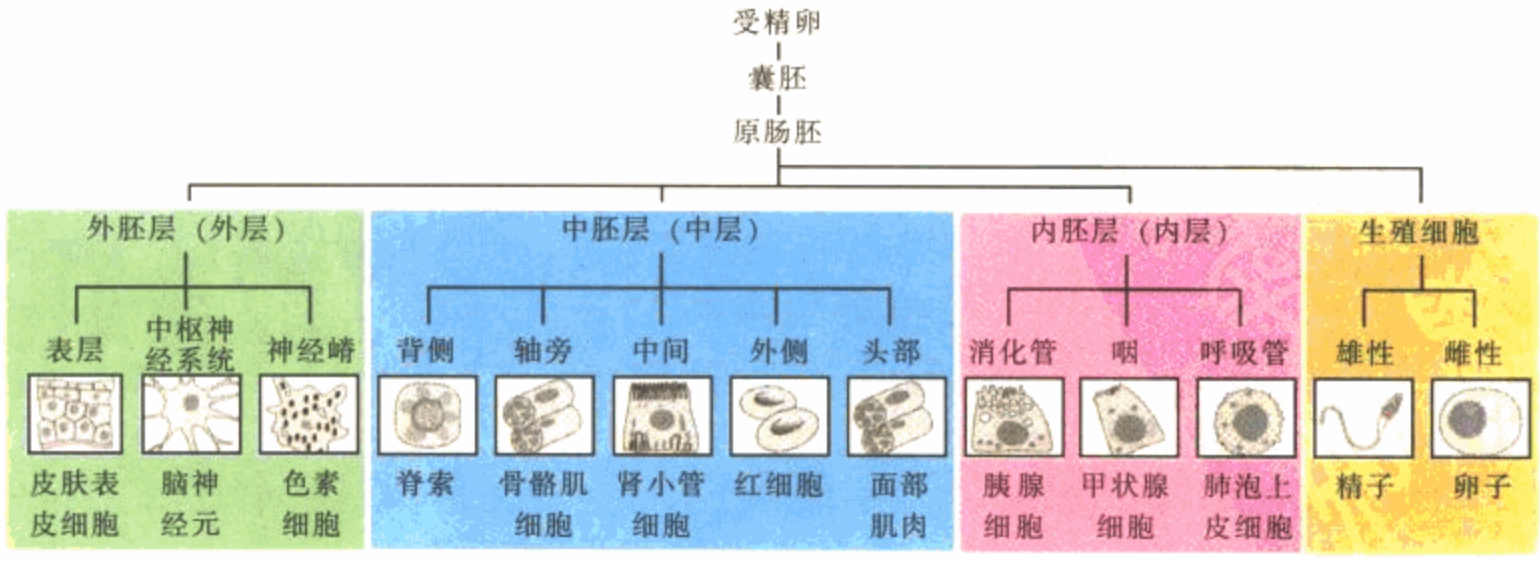
第一节　细胞分化的基本概念

一、多细胞生物个体发育的一般过程与细胞分化潜能

多细胞生物的个体发育一般包括胚胎发育和胚后发育两个阶段，前者包括卵裂、囊胚、原肠胚等几个基本的发育阶段；脊椎动物还要经过神经轴胚期以及器官发生等阶段。细胞分化开始于原肠胚形成之后。

（一）动物胚胎的三胚层代表不同类型细胞的分化去向

多细胞生物的卵细胞在受精后立刻进入反复的有丝分裂阶段，这一快速的分裂时期称为卵裂（cleavage），通过卵裂形成由许多细胞组成的球状囊胚（blastula）或扁碟状的胚盘(blastoderm)。囊胚或胚盘形成后，便进入原肠形成（gastrulation）期。原肠期之前细胞间并无可识别的差异。在原肠期，产生了内、中、外三个胚层，它们具有不同的发育和分化去向：内胚层（endoderm）将发育为消化道及其附属器官、唾液腺、胰腺、肝脏以及肺泡的上皮成分；中胚层（mesoderm）将发育成骨骼、肌肉、纤维组织和真皮，以及心血管系统和泌尿系统；外胚层（ectoderm）则形成神经系统、表皮及其附属物(图 14-1)。



● 图 14-1　脊椎动物细胞分化示意图

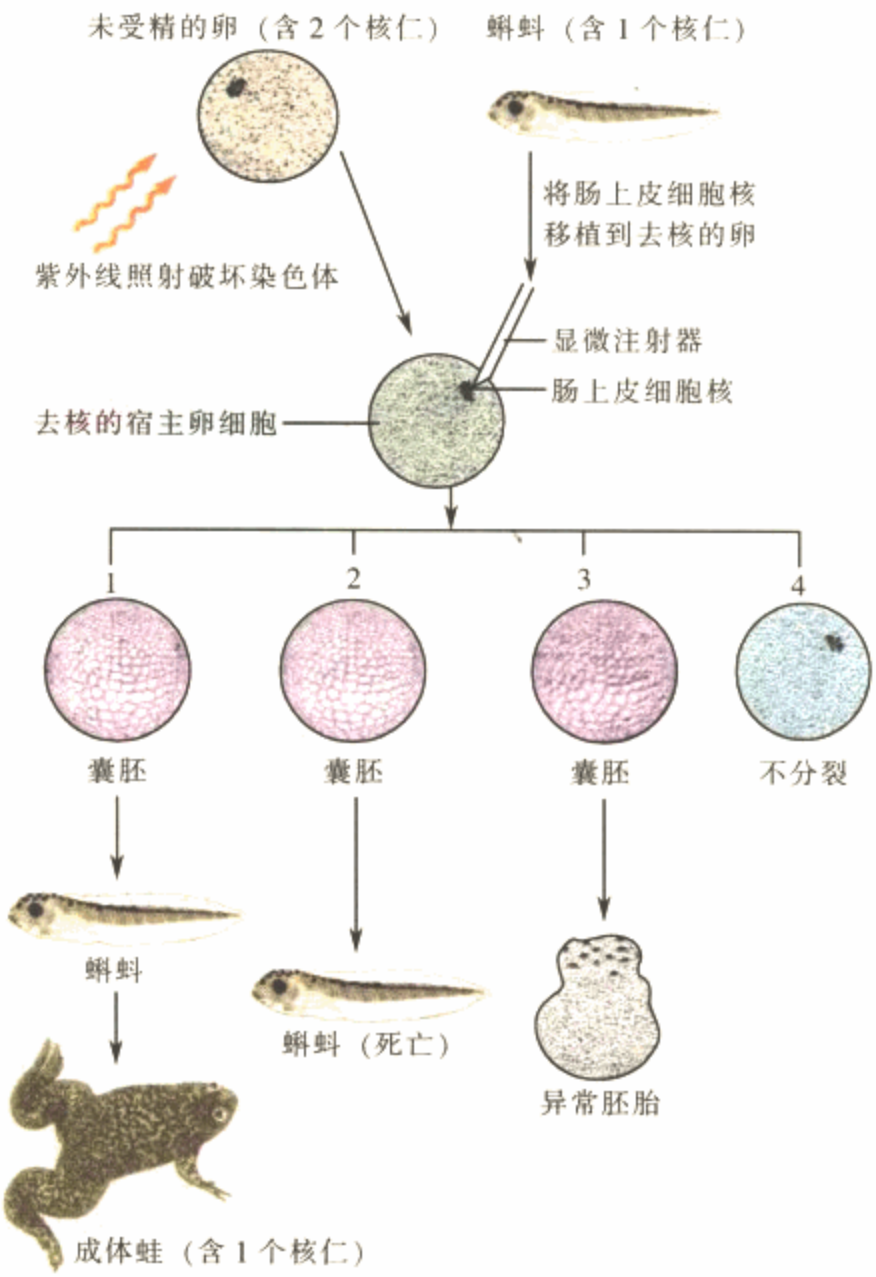
（二）细胞分化的潜能随个体发育进程逐渐“缩窄”

细胞分化贯穿于有机体的整个生命过程之中，但以胚胎期最为典型。研究表明，两栖类动物在囊胚形成之前的卵裂球细胞、哺乳动物桑椹胚的 8 细胞期之前的细胞和其受精卵一样，均能在一定条件下分化发育成为完整的个体。通常将具有这种特性的细胞称为全能（干）细胞（totipotent cell）。在三胚层形成后，由于细胞所处的空间位置和微环境的差异，细胞的分化潜能受到限制，各胚层细胞只能向本胚层组织和器官的方向分化发育，而成为多能（干）细胞（pluripotent cell）。经过器官发生（organogenesis），各种组织细胞的命运最终确定，呈单能（unipotency）化。这种在胚胎发育过程中，细胞逐渐由“全能”到“多能”，最后向“单能”的趋向，是细胞分化的一般规律。

应当指出的是，大多数植物和少数低等动物（如水螅）的体细胞仍具有全能性；而在高等动物和人类，至成体期，除一些组织器官保留了部分未分化的细胞（干细胞）之外，其余均为终末分化细胞。

（三）终末分化细胞的细胞核具有全能性

动物受精卵子代细胞的全能性随其发育过程逐渐受到限制而变窄，即由全能性细胞转化为多能和单能干细胞，直至分化为终末细胞。但在细胞核则完全不同，终末分化细胞的细胞核仍然具有全能性，谓之全能性细胞核（totipotent nucleus）。20 世纪 60 年代初期，用非洲爪蟾为材料，进行核移植实验。该实验首先用紫外线照射卵细胞使其细胞核失去活性，然后用微吸管将爪蟾蝌蚪的肠上皮细胞核植入去核的卵细胞中，接受肠上皮细胞核的去核卵可以发育成为正常的爪蟾（图 14-2）。1997 年，英国爱丁堡 Roslin 研究所工作人员将成年绵羊乳腺上皮细胞的细胞核移植到另一只羊的去核卵细胞中，成功地克隆出世界上第一只哺乳动物——“多利”（Dolly）羊（见：第十六章，图 16-7）。继之，世界上有多个实验室培育出多种体细胞克隆动物。这些实验结果表明，已特化的体细胞的细胞核仍保留形成正常个体的全套基因，具有发育成一个有机体的潜能。



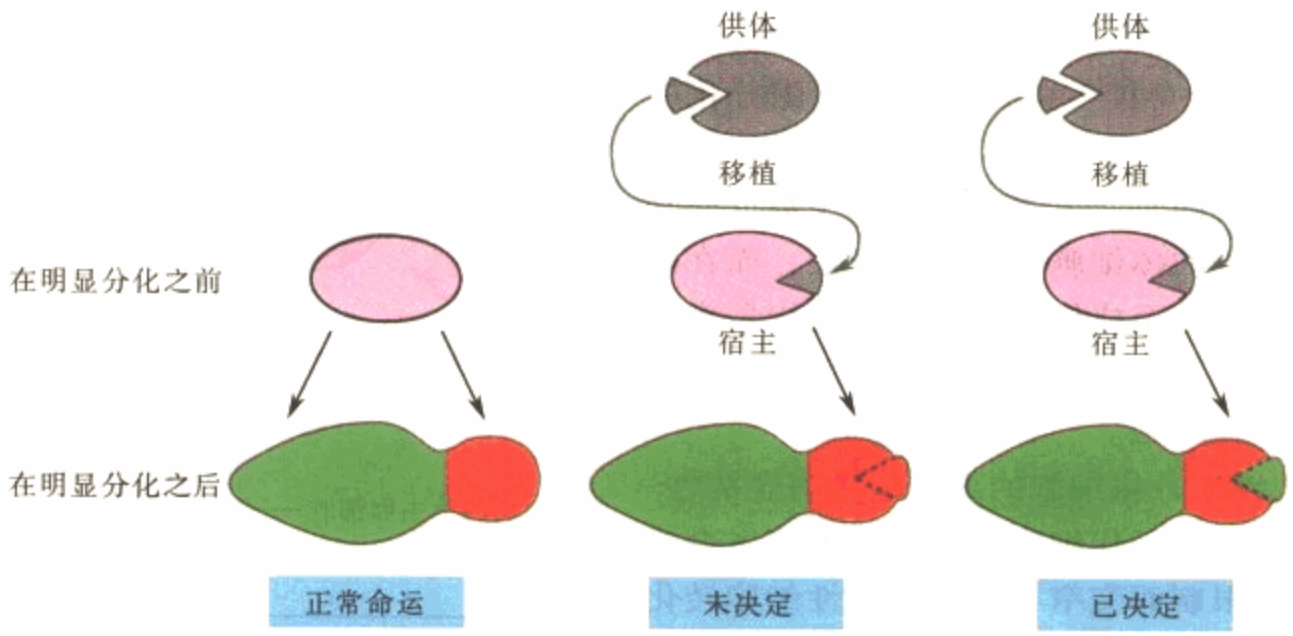
● 图 14-2　爪蟾细胞核移植实验证明了已分化细胞的细胞核具有全能性

二、细胞决定与细胞分化

（一）细胞决定先于细胞分化并制约着分化的方向

在个体发育过程中，细胞在发生可识别的分化特征之前就已经确定了未来的发育命运，只能向特定方向分化的状态，称之为细胞决定（cell determination）。在原肠期的内、中、外三胚层形成时，虽然在形态学上看不出有什么差异，但此时形成各器官的预定区已经确定，每个预定区决定了它只能按一定的规律发育分化成特定的组织、器官和系统。

细胞决定可通过胚胎移植实验（grafting experiment）予以证明。例如在两栖类胚胎，如果将原肠胚早期预定发育为表皮的细胞（供体），移植到另一个胚胎（受体）预定发育为脑组织的区域，供体表皮细胞在受体胚胎中将发育成脑组织，而到原肠胚晚期阶段移植时则仍将发育成表皮。这表明，在两栖类的早期原肠胚和晚期原肠胚之间的某个时期便开始了细胞决定，一旦决定之后，即使外界的因素不复存在，细胞仍然按照已经决定的命运进行分化（图 14-3）。



● 图 14-3　细胞决定实验示意图

细胞的分化去向源于细胞决定，是什么因素决定了胚胎细胞的分化方向？迄今尚不清楚。现有研究资料提示，有两种因素在细胞决定中起重要作用：一是卵细胞的极性与早期胚胎细胞的不对称分裂，二是发育早期胚胎细胞间的相互作用。细胞的不对称分裂是指存在于核酸蛋白颗粒（RNP）中的转录因子 mRNA 在细胞质中的分布是不均等的，当细胞分裂时，这些决定因素（mRNA）被不均匀地分配到两个子细胞中，结果造成两个子细胞命运的差异。

（二）细胞决定具有遗传稳定性

细胞决定表现出遗传稳定性，典型的例子是果蝇成虫盘细胞的移植实验。成虫盘是幼虫体内已决定的尚未分化的细胞团，在幼虫发育的变态期之后，不同的成虫盘可以逐渐发育为果蝇的腿、翅、触角等成体结构。如果将成虫盘的部分细胞移植到一个成体果蝇腹腔内，成虫盘可以不断增殖并一直保持于未分化状态，即使在果蝇腹腔中移植多次、经历 1 800 代之后再移植到幼虫体内，被移植的成虫盘细胞在幼虫变态时，仍能发育成相应的成体结构。这说明果蝇成虫盘细胞的决定状态是非常稳定并可遗传的。

人们在认识到细胞决定的稳定性和可遗传性的同时，也开始探索细胞决定的可逆性。在果蝇研究中发现，有时某种培养的成虫盘细胞会出现不按已决定的分化类型发育，而是生长出不是相应的成体结构，发生了转决定（transdetermination）。探讨转决定的发生机制对了解胚胎细胞命运的决定具有重要意义。

三、细胞的去分化和转分化

（一）细胞分化具有高度的稳定性

细胞分化的稳定性（stability）是指在正常生理条件下，已经分化为某种特异的、稳定类型的细胞一般不可能逆转到未分化状态或者成为其他类型的分化细胞。例如，神经元在

整个生命过程中都保持着特定的分化状态。已分化的终末细胞在形态结构和功能上保持稳定是个体生命活动的基础。细胞分化的稳定性还表现在离体培养的细胞，例如，一个离体培养的皮肤上皮细胞保持为上皮而不转变为其他类型的细胞；黑色素细胞在体外培养 30 多代后仍能合成黑色素。

（二）已分化的细胞可发生去分化

一般情况下，细胞分化过程是不可逆的。然而在某些条件下，分化了的细胞也不稳定，其基因活动模式也可发生可逆性的变化，而又回到未分化状态，这一变化过程称为去分化（dedifferentiation）。例如，高度分化的植物细胞在实验室的培养条件下，可失去分化特性，重新进入未分化状态，成为能够发育分化为一株完整植物的全能性细胞。目前尚未见到高等动物细胞完全去分化而成为全能性细胞的现象，但部分去分化的例子较多，如蝾螈肢体再生时形成的胚芽细胞及人类的各种肿瘤细胞等。

（三）特定条件下已分化的细胞可转分化为另一种类型细胞

在高度分化的动物细胞中还可见到另一种现象，即从一种分化状态转变为另一种分化状态，这种情况称为转分化（transdifferentiation）。

细胞通过转分化能形成一种发育相关的细胞类型。典型的例子可见于肾上腺的嗜铬细胞。体积较小的嗜铬细胞源于神经嵴并且分泌肾上腺素入血。在培养条件下，加入糖皮质激素可以维持嗜铬细胞的表型，但是当去除甾体激素并在培养基中加入神经生长因子之后，嗜铬细胞转分化成交感神经元，这些神经元比嗜铬细胞大，带有树突样和轴突样突起，并且分泌去甲肾上腺素而非肾上腺素（图 14-4）。

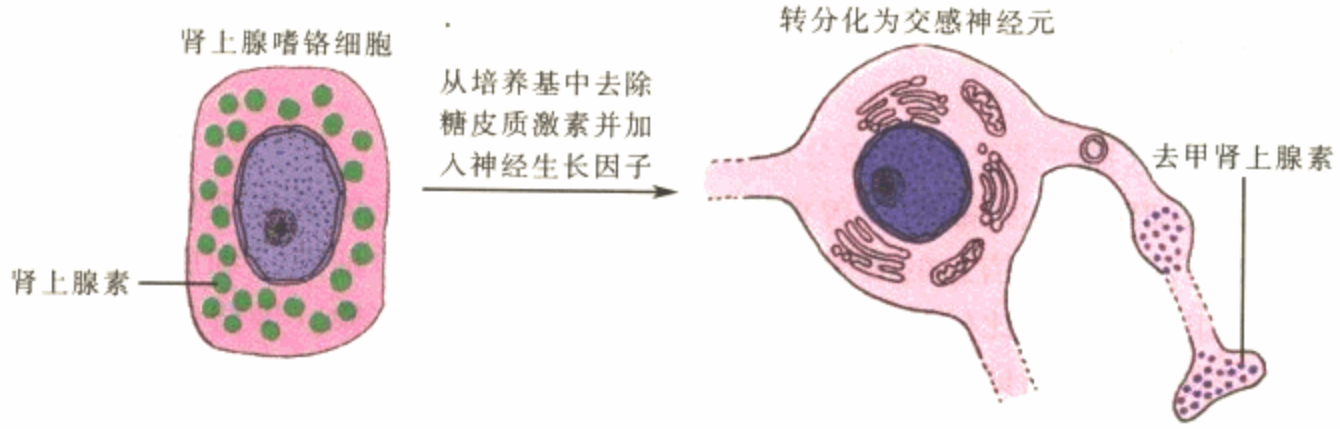


图 14-4　细胞转分化示意图

通过转分化形成不同发育类型细胞的例子也较常见。例如，水母横纹肌可由一种细胞类型连续转分化成两种不同类型的细胞。离体的横纹肌与其相关的细胞外基质共同培养时，可以保持横纹肌的状态。在用能降解细胞外基质的酶处理培养组织之后，细胞将形成一个聚合体，其中有些细胞在 1~2 天内转分化为平滑肌细胞，继续培养时，可形成第二种类型的细胞——神经元。另一些例子是，经生肌蛋白（myogenin）基因 *MyoD* 转染的成纤维细胞或脂肪细胞可分化为成肌细胞；神经元是分化终末细胞，但近些年研究发现，在特定条件下可转变为血细胞和脂肪细胞。

必须指出的是，无论是动物还是植物，细胞分化的稳定性是普遍存在的，而分化的可逆性，即发生细胞的转分化或去分化是有条件的。

四、细胞分化的时-空性

在个体发育过程中，多细胞生物细胞既有时间上的分化，也有空间上的分化。一个细胞在不同的发育阶段可以有不同的形态结构和功能，即时间上的分化；同一种细胞的后

代，由于每种细胞所处的空间位置不同，其环境也不一样，可以有不同的形态和功能，即空间上的分化。在高等动植物个体胚胎发育过程中，随着细胞数目的不断增加，细胞的分化越来越复杂，细胞间的差异也越来越大；同一个体的细胞由于所处的空间位置不同而确定了细胞的发育命运，出现头与尾、背与腹等不同。这些时-空差异为形成功能各异的多种组织和器官提供了基础。

五、细胞分裂与细胞分化

细胞分裂和细胞分化是多细胞生物个体发育过程中的两个重要事件，两者之间有密切的联系。通常细胞在增殖（细胞分裂）的基础上进行分化，而早期胚胎细胞的不对称分裂所引起的细胞质中转录因子的差异制约着细胞的分化方向和进程。细胞分化发生于细胞分裂的 G_1 期，在早期胚胎发育阶段特别是卵裂过程中，细胞快速分裂，G_1 期很短或几乎没有 G_1 期，此时细胞分化减慢。细胞分裂旺盛时分化变缓，分化较高时分裂速度减慢是个体生长发育的一般规律。例如哺乳动物的表皮角质层细胞等终末细胞分化程度较高，分裂频率明显减慢，而高度分化的细胞，如神经元和心肌细胞则很少分裂或完全失去分裂能力。

第二节　细胞分化的分子基础

一、基因组的活动模式

（一）基因的选择性表达是细胞分化的普遍规律

人们在认识细胞分化机制中，曾根据少数分化细胞的染色体丢失现象而错误地认为细胞分化的本质是源于遗传信息的丢失或突变。后来大量的实验证明，细胞分化过程中一般并不伴有基因组的改变。比较著名的实验，如体细胞核移植实验，即将动物体细胞的核移植到去核的卵细胞或受精卵的细胞质中，然后观察重组的卵细胞（有新的细胞核）是否能够发育成为成体，如此相继克隆出爪蟾、多利羊等动物，证明了细胞分化并不是由于基因丢失或永久性地失去活性造成的，维持发育所需要的基因并没有发生不可逆的改变，当体细胞核暴露于卵细胞质中之后，它的作用就如同一个受精卵的细胞核基因一样。此外，细胞转分化现象的发现，以及细胞融合实验等也表明细胞分化过程中一般不发生基因组的改变。

经典实验：细胞核移植与细胞分化机制研究

研究背景

细胞分化的本质和规律一直是细胞生物学家和发育生物学家关注的重要研究领域。在早期研究中，细胞分化过程中是否伴随基因组的改变一直困扰着生物学家，特别是在果蝇的一些细胞中观察到基因组的扩增，在马蛔虫发育过程中发现染色体的不断丢失；同时在早期胚胎细胞的全能性研究中，因实验条件的限制，所获得的实验结果也各异。这就要求生命科学工作者回答，细胞分化的本质是什么，已分化的细胞核是否具有全能性。1938 年，诺贝尔奖获得者 H. Spemann 在他所著的《胚胎发育和诱导》一书中，提出了一个设想性方案：将一个分化了的细胞核导入到去核的卵细胞中，然后观察其

发育情况。但这类工作直到14年之后才开始。1952至1962年间，R. Briggs、T. King和J. Gurdon等开展了细胞核移植实验。Gurdon成功克隆出了成体爪蟾。

实验内容

为证明细胞分化过程中是否伴随遗传信息（基因）的不可逆变化，在20世纪60年代初期，Gurdon用非洲爪蟾为材料，进行了著名的细胞核移植实验。他从一种突变型蝌蚪(细胞核中只有1个核仁）的肠上皮细胞中取出细胞核，将其移植到事先用紫外线照射的胞核有2个核仁的野生型爪蟾的未受精卵中（紫外线照射破坏了野生型未受精卵中的细胞核），这种含有肠上皮细胞核的受精卵有的能发育成囊胚，其中有少数可发育成蝌蚪和成体爪蟾，成体爪蟾中的细胞核均含一个核仁。该实验结果表明，已分化的肠上皮细胞核中仍然保持着能分化出成体爪蟾各种组织细胞的全部基因（图14-2）。

发表论文

John Gurdon（University of Oxford，UK）：

The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelial cells of feeding tadpoles. J. Embryol Exp. Morphol.，1962，10：622-640

后续影响

Gurdon最初的想法是研究分化成熟细胞的细胞核是否具有全能性，却意外地克隆了蛙。他的实验不仅为细胞分化的本质和规律提供了有力证据，而且为动物克隆(animal clone）研究提供了完整的技术路线。1997年，英国爱丁堡Roslin研究所的Wilmut和其同事将成年绵羊的乳腺上皮细胞的细胞核移植到另一只羊的去核的卵细胞中，成功地克隆出世界上第一只哺乳动物——“多利”（Dolly）羊。随后，一系列克隆动物如克隆牛和克隆狗等也相继问世。这些克隆性研究进展，给人类难治性疾病的治疗和器官移植材料的来源带来了期盼，一种以疾病治疗为目的的人类治疗性克隆研究在不断的伦理争吵声中逐步迈向医学科学殿堂。

已如上述，细胞分化不伴随基因组的改变，那么基因组的活动模式是什么？大量研究表明，多细胞生物个体发育与细胞分化过程中，其基因组DNA并不全部表达，而呈现选择性表达，它们按照一定的时-空顺序，在不同细胞和同一细胞的不同发育阶段发生差异表达（differential expression）。一般认为，在已分化的成体细胞中能够表达的基因仅占基因总数的5%左右，其余大部分基因都处于抑制状态。例如，鸡的输卵管细胞合成卵清蛋白，胰岛细胞合成胰岛素，成红细胞合成β-珠蛋白，这些细胞都是在个体发育过程中逐渐产生的。用相应的基因制作探针，对三种细胞总的DNA的限制性酶切片段进行Southern杂交实验。结果显示，上述三种细胞的基因组DNA中均存在卵清蛋白基因、胰岛素基因和β-珠蛋白基因。然而用同样的三种基因片段作探针，对这三种细胞中提取的总RNA进行Northern杂交实验，结果表明，输卵管细胞中只有卵清蛋白mRNA，胰岛素细胞只有胰岛素mRNA，成红细胞只有β-珠蛋白mRNA。正是这些决定细胞特性的基因的差异表达，形成了不同类型的分化细胞。通常将编码组织细胞特异性蛋白的基因称为奢侈基因（luxury gene），其编码的蛋白质谓之奢侈蛋白（luxury protein），它们仅存在于特定的分化细胞中，如红细胞中的血红蛋白、皮肤表皮细胞中的角蛋白、肌细胞的肌动蛋白和肌球蛋白。这些特异性蛋白赋予了分化细胞的不同特征。当然，一个分化细胞的基因表达产物不仅仅是奢侈蛋白，也包含由管家基因（housekeeping gene）表达的管家蛋白，这类蛋白是维持细胞生存所必需的基本蛋白，存在于所有分化类型的细胞中，如细胞骨架蛋白、膜蛋白、染色质的组蛋白、核糖体蛋白、以及参与能量代谢的糖酵解酶类等。因此，细胞分化的本质是基因的选择性表达，一些基因处于活化状态，同时另一些基因被抑制而

不活化。

（二）基因组改变是细胞分化的特例

早期的研究显示，一些分化的细胞，例如果蝇的腺细胞和卵巢滤泡细胞在其分化过程中基因组发生了量的变化，表现为特定基因的选择性扩增；在果蝇的其他一些细胞，像卵巢中的营养细胞、唾液腺细胞和马尔皮基氏管细胞的发育过程中，还呈现出基因组扩增现象，染色体多次复制，形成多倍体（polyploid）和多线体（polyteny）。

一些细胞在分化过程中则发生基因组（染色质或染色体）的丢失。在马蛔虫（*Assaris lumbricoides*）个体发育过程中，只有生殖细胞得到了完整染色体，而体细胞中的染色体只是部分染色体片段，其余的染色体丢失了。在有些生物个体发育中，还可观察到完整的染色体或完整的核丢失。例如，在摇蚊（*Wachtiella persicariae*）发育中，许多体细胞丢失了最初 40 条染色体中的 38 条；而哺乳动物（除骆驼外）的红细胞以及皮肤、羽毛和毛发的角化细胞则丢失了完整的核。

在脊椎动物和人类免疫细胞发育研究中发现，执行抗体分泌功能的 B 淋巴细胞分化的本质是由于编码抗体分子的基因发生了重排。在 B 淋巴细胞分化中，DNA 通过体细胞重组（somatic recombination），使 DNA 序列中不同部位的部分基因片段连接在一起，组成产生抗体 mRNA 的 DNA 序列。

基于以上事例，人们对细胞分化的机制曾提出过一些假说，如基因扩增、DNA 重排和染色体丢失等。但这些现象并不是细胞分化的普遍规律。

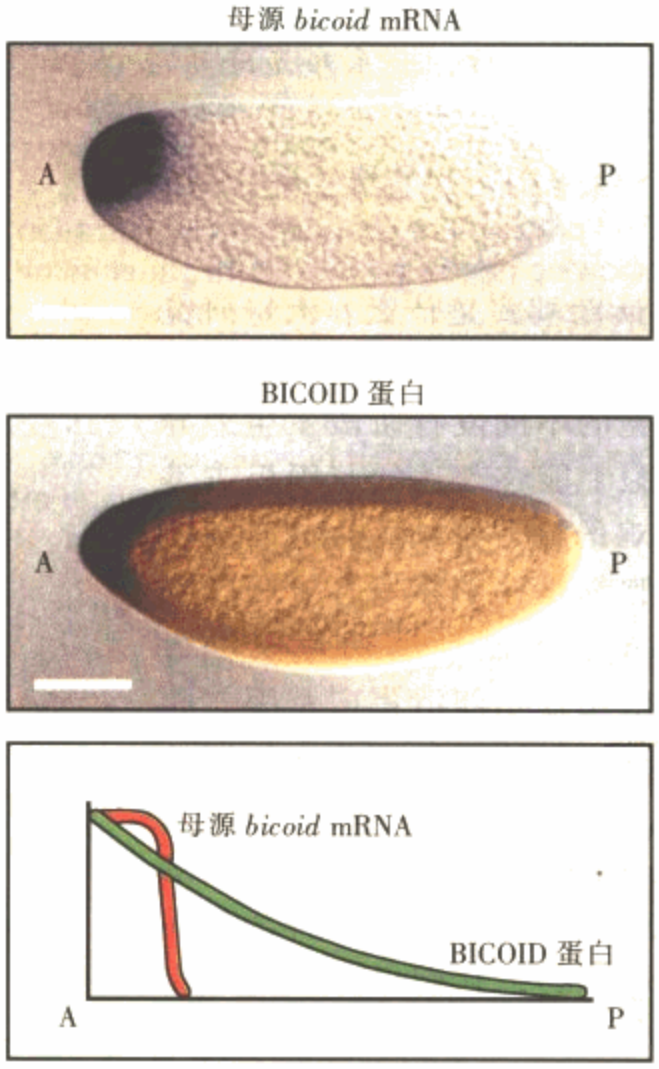


图 14-5　受精前后 *bicoid* 基因 mRNA 及翻译蛋白的浓度梯度分布

上图为果蝇胚胎的核酸原位杂交照片；中图为果蝇胚胎的免疫组化照片；下图为受精前后浓度梯度分布示意图（A：前端；P：后端）

二、胞质中的细胞分化决定因子与传递方式

（一）母源效应基因产物的极性分布决定了细胞分化与发育的命运

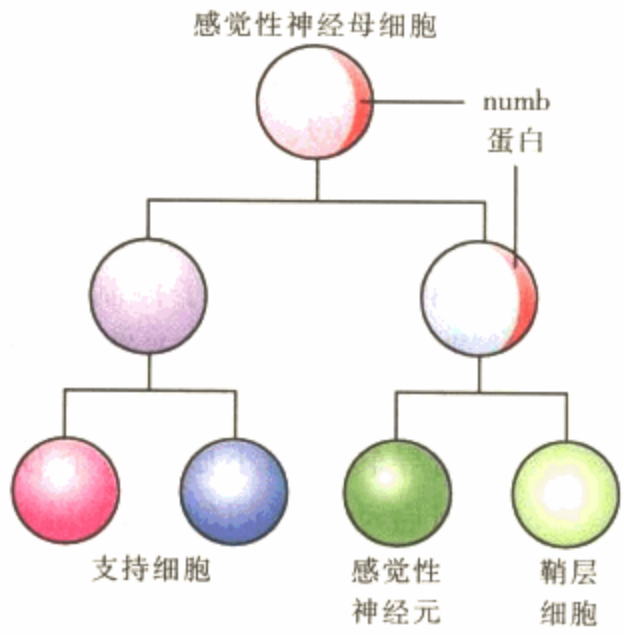
一些研究提示，成熟的卵细胞中储存有 20 000~50 000 种 RNA，其中大部分为mRNA。这些 mRNA 直到受精后才被翻译为蛋白质。其中部分 mRNA 在卵质中的分布不均，如爪蟾未受精卵中，有些 mRNA 特异地分布于动物极，有些则分布在植物极，它们在细胞发育命运的决定中起重要作用。通常将这些在卵质中呈极性分布、在受精后被翻译为在胚胎发育中起重要作用的转录因子和翻译调节蛋白的 mRNA 分子称为母源效应基因(maternal effect gene，MEG)产物。

在果蝇中，母源效应基因得到了比较深入的研究。果蝇和一般的脊椎动物有所不同，其母源效应基因预先决定了子代未来的相互垂直的前-后轴和背-腹轴。例如果蝇 *bicoid* 基因的 mRNA，在未受精时，它定位于卵母细胞的一端，即将来发育为胚胎的前端。受精后*bicoid* mRNA 被翻译为蛋白质，因有限的扩散，建立了 BICOID 蛋白梯度：BICOID 蛋白沿胚胎前-后轴呈浓度梯度分布，越靠近胚胎的前端，其浓度越高（图 14-5）。BICOID 蛋白含有一个螺旋-转角-螺旋结构域（helix-turn-helix domain），它与卵前部区域的胚胎细胞核染色体结合（果蝇的早期胚胎为多个细胞核共存于一个细胞质中的合胞体），高浓度的BICOID 蛋

白启动了头部发育的特异性基因的表达，而低浓度的 BICOID 蛋白则与形成胸部的特异性基因表达有关。

（二）胚胎细胞分裂时胞质的不均等分配影响细胞的分化命运

在胚胎早期发育过程中，细胞质成分是不均质的，胞质中某些成分的分布有区域性。当细胞分裂时，细胞质成分被不均等地分配到子细胞中，这种不均一性胞质成分可以调控细胞核基因的表达，在一定程度上决定细胞的早期分化。例如在果蝇感觉器官的发育过程中，细胞命运的决定物之一是 *numb* 基因编码的蛋白。该蛋白在感觉性神经母细胞的胞质中呈非对称分布，以致细胞在第一次分裂时只有一个子细胞中含有 numb 蛋白，这个子细胞在第二次分裂时产生了神经元及其鞘层细胞，而缺乏 numb 蛋白的细胞则生成支持细胞（图14-6）。numb 蛋白对神经元及鞘层细胞的形成是必需的。在缺乏 numb 蛋白的胚胎中，那些本应该发育成神经元和鞘层细胞的细胞却发育成为外层的支持细胞。



●图 14-6　早期胚胎细胞不对称分裂示意图

三、基因选择性表达的转录水平调控

在不同分化类型的细胞中，基因的表达差异很大。某个基因在一类细胞中激活而在另一种细胞中却相反。那么，是什么因素决定了分化细胞中的特异性基因表达呢？研究表明，细胞分化的基因表达调控主要发生在转录水平。调节基因转录的因素有很多（详见第九章），这里主要介绍在细胞分化过程中基因表达调控的特点。

（一）组织细胞特异性转录因子和活性染色质结构区决定了细胞特异性蛋白的表达

在个体发育或细胞分化期间被激活的基因通常有复杂的调控区域（control region），它包括启动子区和其他能调节基因表达的 DNA 位点，这些区域中含有转录因子和转录因子调节蛋白的结合位点，在调控区上转录因子和转录因子调节蛋白的相互作用决定了基因是否被激活。

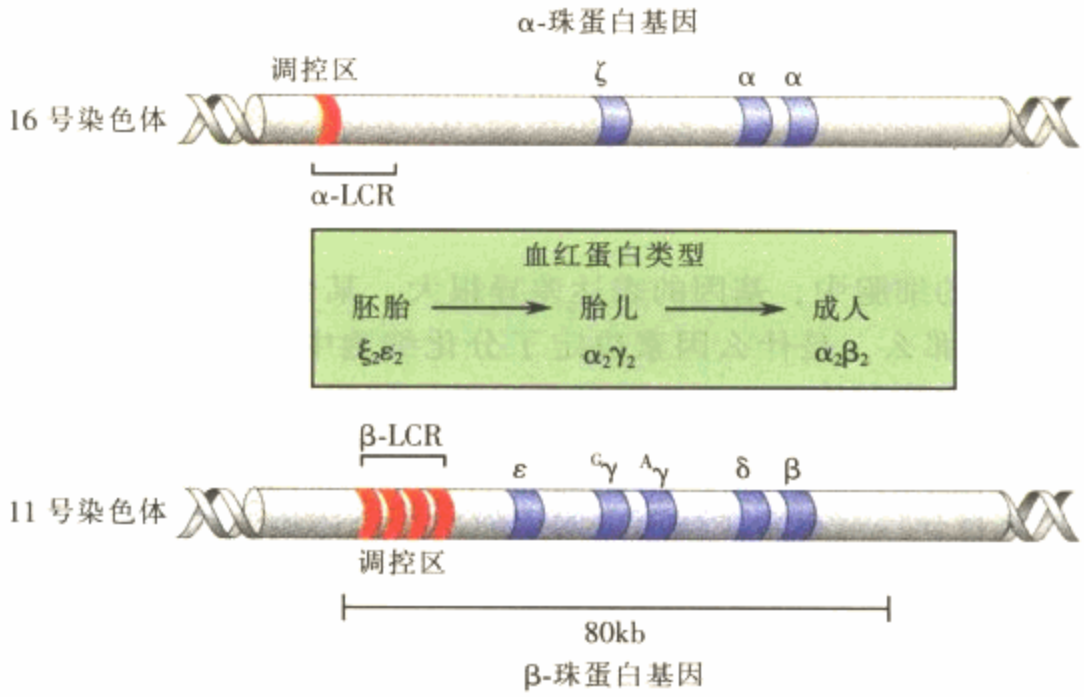
研究表明，与基因表达的调控区相互作用的转录因子有通用转录因子和组织细胞特异性转录因子两大类，前者是指为大量基因转录所需要并在许多细胞类型中都存在的因子；后者则是为特定基因或一系列组织特异性基因所需要，并在一个或很少的几种细胞类型中存在的因子，如在红细胞中表达的血红蛋白的 EFI 因子、在胰岛中表达的胰岛素的 Isl-I 因子、在骨骼肌中表达的肌球蛋白的 MyoDI 因子等。通常情况下，细胞特异性的基因表达是由于仅存于那种类型细胞中的组织细胞特异性转录因子与基因的调控区相互作用的结果。

活性染色质结构的特异调控区在血红蛋白的表达和形成过程中得到了较深入的研究。

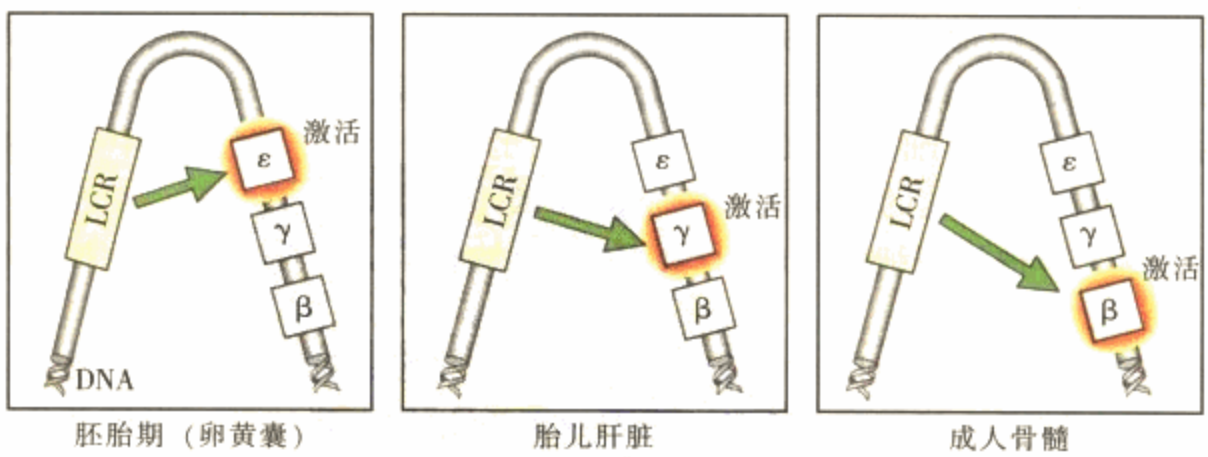
血红蛋白是能够运输氧气的蛋白质，是红细胞分化的主要特征。脊椎动物的血红蛋白由 2 条 α-珠蛋白链和 2 条 β-珠蛋白链组成。α-珠蛋白和 β-珠蛋白基因分别定位于不同染色体上，它们都由一个基因簇（基因家族）构成。在哺乳动物中，每个家族的不同成员都在发育的各个时期被表达，这样，在胚胎、胎儿和成体中分别生成不同的血红蛋白。人β-珠蛋白基因簇包括五个基因—ε、$^{G}\gamma$、$^{A}\gamma$、δ 和 β，这些基因在发育的不同时期表达：ε 在早期胚胎的卵黄囊中表达；$^{G}\gamma$ 和 $^{A}\gamma$ 在胎儿肝脏中表达；δ 和 β 基因在成人骨髓红细胞前体细胞中表达。所有这些基因的蛋白质产物都与由 α-珠蛋白基因编码的 α-珠蛋白结合，

从而在发育的三个时期中分别形成有不同生理特性的血红蛋白（图 14-7）。

在个体发育过程中依次有不同的 β-珠蛋白基因的打开和关闭，这与 β-珠蛋白基因簇上游的基因座控制区（locus control region，LCR）有关。LCR 最初是应用 DNase I 消化实验鉴定的。在成体，只有红细胞（前体细胞）中的 LCR 对 DNase I 敏感。对 DNase I 如此敏感意味着在该区域的染色质没有被紧密包裹，转录因子易于接近 DNA。β-珠蛋白基因簇中每个基因的有效表达，除受到每个基因 5′端上游的启动子和调控位点及基因下游（3′端）的增强子控制之外，还将受到远离 β-珠蛋白基因簇上游的 LCR 的严格制约。LCR 距离 ε 基因的 5′末端约 10 000 碱基对以上（图 14-7）。研究发现，LCR 可使任何与它相连的 β-家族基因呈高水平表达，即使 β-珠蛋白基因本身距离它约 50 000 碱基对，LCR 也能指导转基因小鼠中整个 β-珠蛋白基因簇的顺序表达。有研究者认为，LCR 区和珠蛋白基因启动子之间的 DNA 呈袢环状，这样，结合到 LCR 的蛋白能够比较容易地与结合到珠蛋白基因启动子上的蛋白发生相互作用。例如，在胚胎的卵黄囊细胞中，LCR 将与 ε 基因的启动子相互作用，在胎肝中则与两个 γ 启动子相互作用，最后在骨髓来源的红细胞中，与 β-基因启动子相互作用（图 14-8）。



●图 14-7　人珠蛋白基因结构



●图 14-8　LCR 控制的 β-珠蛋白基因活化的可能机制

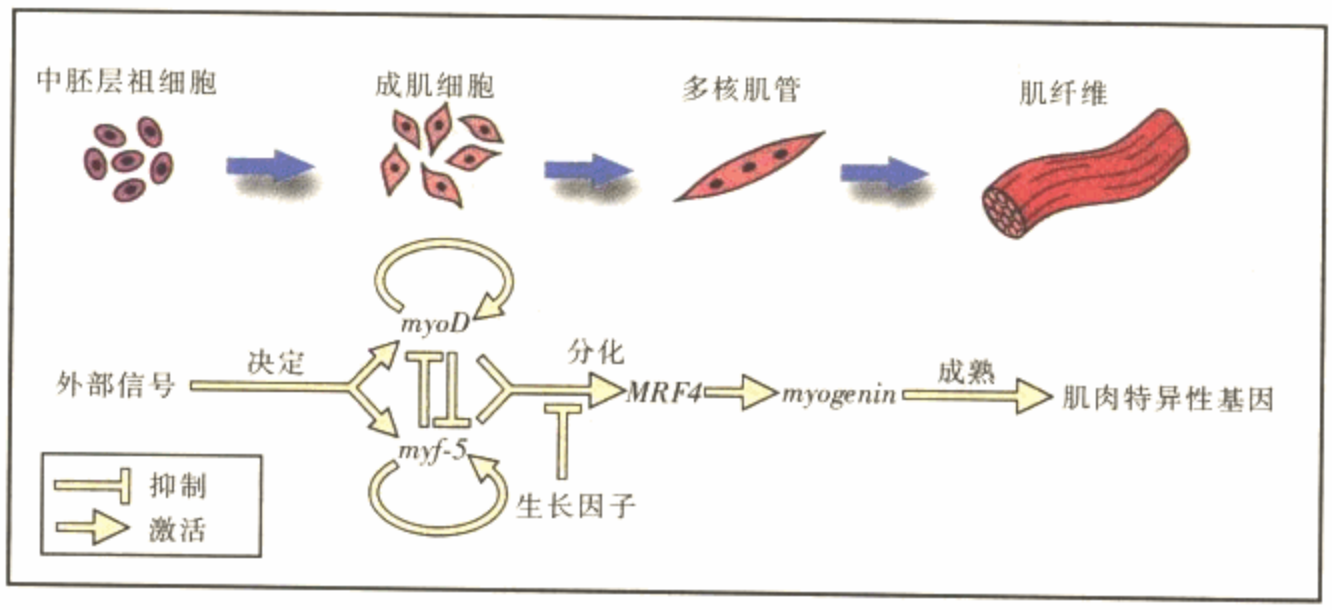
LCR 在发育的不同阶段依次与每个基因的启动子相互作用，从而控制它们的时间顺序性表达

在 LCR 区域中含有分别为 300 个碱基对左右的 4 个“核心”控制区，其中的每个区都有与少数几个特异性转录因子的结合位点，如转录因子 NF-E2 和在红细胞中高水平表达的GATA-1。LCR 的其余位点则与通用转录因子结合。

（二）转录因子的顺序表达启动特定谱系细胞的分化

在细胞分化与发育过程中，转录因子比较普遍的作用方式是：一个表达的转录因子能同时调控几个基因的表达，表现为同时发生的某些基因的激活和某些基因的关闭。例如，在果蝇体节发育过程中，母源效应基因 *bicoid* 所调节的分节基因（gap gene）的表达即属于这种类型。

细胞分化中基因活化的另一种方式是，作为转录因子的基因产物本身起正反馈调节蛋白作用。这样一来，维持一系列细胞分化基因的活动只需要激活基因表达的起始事件，即特异地参与某一特定发育途径的起始基因。该基因一旦打开，它就维持在活化状态，表现为能充分的诱导细胞沿着某一分化途径进行，从而导致特定谱系细胞的发育。具有这种正反馈作用的起始基因通常称为细胞分化主导基因（master control gene）。例如，在哺乳动物的成肌细胞向肌细胞分化过程中，*myoD* 基因起重要作用。*myoD* 在肌前体细胞和肌细胞中表达，它的表达将引起某一级联反应，包括 *MRF4*、*Myogenin* 基因的顺序活化，导致肌细胞分化（图 14-9）。*MyoD*、*MRF4* 和 *Myogenin* 都编码一个含有碱性的螺旋-环-螺旋（bHLH）的 DNA 结合域的转录因子。一般将 *myoD* 基因视为肌细胞分化的主导基因。有趣的是，经 *myoD* 基因转染的成纤维细胞以及其他一些类型的细胞也能够分化为肌细胞。



● 图 14-9　脊椎动物骨骼肌细胞分化机制

外部信号通过激活 *myoD* 和 *myf-5* 基因而启动肌细胞分化，这两个基因中的哪一个优先表达取决于物种的不同，且它们的基因活动形成交互抑制并维持自身状态，其编码蛋白进一步激活 *MRF4* 和 *myogenin* 基因，最终导致肌细胞特异性基因表达

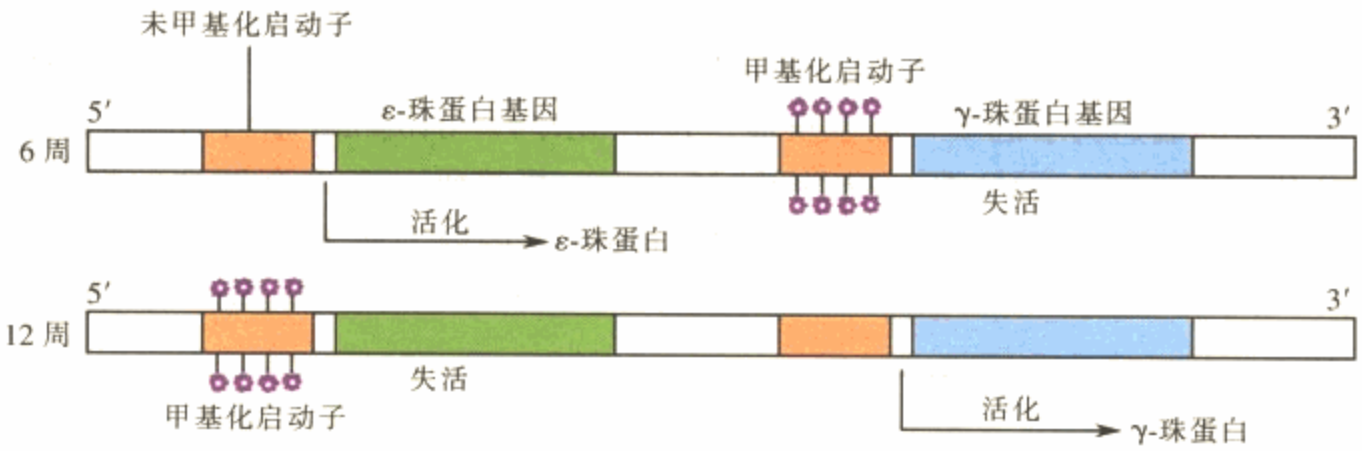
（三）染色质成分的共价修饰制约基因的转录

染色质成分的共价修饰包括：①DNA 的甲基化；②组蛋白的乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化、糖基化和羰基化，其中乙酰化和甲基化是组蛋白的主要修饰形式。DNA 和组蛋白的修饰都会引起染色质结构和基因转录活性的变化。染色质成分的共价修饰在基因转录调控上的作用是可遗传的。DNA 甲基化和组蛋白修饰模式在胚胎发育早期是如何建立的目前尚不清楚。

1. DNA 甲基化在转录水平上调控细胞分化的基因表达　在甲基转移酶催化下，DNA 分子中的胞嘧啶可转变成 5-甲基胞嘧啶，这称为 DNA 甲基化。甲基化常见于富含 CG 二核苷酸的 CpG 岛。甲基化是脊椎动物基因组的重要特征之一，它可以通过 DNA 复制直接遗传给子代 DNA。哺乳动物的基因组中约 70%~80%的 CpG 位点是甲基化的，主要集中于异染色质区，其余则散在于基因组中。

DNA 甲基化对基因活性的影响之一是启动子区域的甲基化。研究表明，DNA 的甲基

化位点阻碍转录因子结合，甲基化程度越高，DNA 转录活性越低，而绝大多数管家基因持续表达，它们多处于非甲基化状态。DNA 甲基化参与转录调控的直接证据来自对基因的活化与胞嘧啶甲基化程度的直接观察。例如在人类红细胞发育中，与珠蛋白合成有关的 DNA 几乎无甲基化，而在其他不合成珠蛋白的细胞中，相应的 DNA 部位则高度甲基化。在胚胎期卵黄囊，ε-珠蛋白基因的启动子未甲基化，而 γ-珠蛋白基因的启动子则甲基化，因此在胚胎期 ε-珠蛋白基因开放，γ-珠蛋白基因关闭；至胎儿期，在胎儿肝细胞中与合成胎儿血红蛋白有关的基因，如 γ-珠蛋白基因没有甲基化，但在成体肝细胞中相应的基因则被甲基化（图 14-10）。可见在发育过程中，当某些基因的功能完成之后，甲基化可能有助于这些基因的关闭。



●图 14-10　人类胚胎红细胞中珠蛋白基因的甲基化

甲基化作用也与基因组印记（genomic imprinting）有关。哺乳动物细胞是二倍体，含有一套来自父方的基因和一套来自母方的基因。在某些情况下，一个基因的表达与其来源有关，即只允许表达其中之一，这种现象被称为基因组印记，与之相关的基因谓之印记基因（imprinted gene）。印记基因在哺乳动物的发育过程中普遍存在。多数情况下来源于父方和母方的等位基因都同时表达，但印记基因仅在特定的发育阶段和特定的组织中表达等位基因中的一个，即在某种组织细胞中，有些仅从父源染色体上表达，有些仅从母源染色体上表达。研究资料显示，在小鼠配子生成和胚胎发育早期，印记基因是选择表达还是关闭，其可能机制是在特定发育时期对印记基因的甲基化。

此外，在哺乳动物（雌性）和人类女性的两条 X 染色体中，其中一条灭活（钝化）的 X 染色体就与 DNA 的甲基化有关，去甲基化可以使钝化的 X 染色体基因重新活化。

DNA 甲基化导致基因失活（或沉默）的可能机制是：①甲基化直接干扰转录因子与启动子中特定的结合位点的结合；②甲基化所致的基因沉默可能是由特异的转录抑制因子直接与甲基化 DNA 结合引起的；③基因沉默是由染色质结构的改变引起的。研究表明，DNA 甲基化只有在染色质浓缩形成致密结构以后才能对基因的转录产生抑制作用。

2. 组蛋白的乙酰化和去乙酰化影响转录因子与 DNA 的结合　最初，染色质上的组蛋白被认为仅仅是维系染色质或染色体结构的组成成分，现在人们认识到，在细胞分化与发育过程中，组蛋白的结构是动态变化的，这种变化影响了染色质结构的构型和伴随的转录因子能否靠近 DNA，从而调节基因的表达。组蛋白结构的改变源于组蛋白中被修饰的氨基酸。组蛋白 H3 和 H4 的 N-端氨基酸残基，组蛋白 H2A、H2B 与 H1 的 N-端和 C-端氨基酸残基，均可发生多种修饰，像乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化、糖基化和羰基化等。组蛋白中被修饰氨基酸的种类、位置和修饰类型被称为组蛋白密码（histone code），它决定了染色质转录活跃或沉默的状态。

乙酰化是常见的组蛋白修饰形式。在组蛋白乙酰基转移酶作用下，于组蛋白 N-端尾部的赖氨酸加上乙酰基，称为组蛋白乙酰化。组蛋白 N-端的赖氨酸残基乙酰化会移去正

电荷，降低组蛋白和 DNA 之间的亲和力，使得 RNA 聚合酶和转录因子容易进入启动子区域。因此，在大多数情况下，组蛋白乙酰化有利于基因转录。低乙酰化的组蛋白通常位于非转录活性的常染色质区域或异染色质区域。一些组蛋白可以快速地乙酰化，然后又去乙酰化，使得组蛋白结合基因的表达受到精确地调控。组蛋白的去乙酰化由组蛋白去乙酰化酶催化完成，组蛋白去乙酰化则抑制转录。

（四）同源盒基因规划机体前–后体轴结构的分化与发育蓝图

1983 年，瑞士 Gehring 实验室的工作人员在研究绘制果蝇触角足复合体（Antennapedia complex，Antp）基因外显子图谱过程中发现，Antp cDNA 不仅与 *Antp* 基因编码区杂交，也与同一染色体上相邻的基因 *ftz*（fushitarazu，ftz）杂交，提示在 *Antp* 和 *ftz* 基因中都含有一个共同的 DNA 片段。随后利用这个 DNA 片段为探针，相继发现在果蝇的许多同源异形基因（homeotic gene）中都含有这个相同的 DNA 片段。序列分析显示这个共同的 DNA 片段为 180bp，具有相同的开放读码框架，编码高度同源的由 60 个氨基酸组成的结构单元。后来，这一 DNA 序列又相继在小鼠、人类、甚至酵母的若干基因中被发现。这个共同的 180bp DNA 片段被称为同源盒（homeobox），含有同源盒的基因谓之同源盒基因（homeobox gene）。迄今为止，已发现的同源盒基因有 300 多种，它们广泛分布于从酵母到人类的各种真核生物中，如果蝇的 *HOM* 基因，动物和人类的 *Hox* 基因。由同源盒基因编码的蛋白称为同源域蛋白（homeodomain protein）。同源域蛋白含有同源结构域（homeodomain）和特异结构域（specific domain），特异结构域通常位于同源结构域的上游，靠近蛋白的 N-末端，而同源结构域则靠近蛋白的 C-末端，这两个结构域在其蛋白作为转录因子发挥作用时均起决定性的作用。研究发现，由高度保守的 60 个氨基酸组成的同源结构域，表现为一种拐弯的螺旋-环-螺旋（HLH）立体结构，其中的 9 个氨基酸片段（第 42~50 位）与 DNA 的大沟相吻合，即它能识别其所控制的基因启动子中的特异序列（应答元件），从而引起特定基因表达的激活或阻抑（图 14-11）。

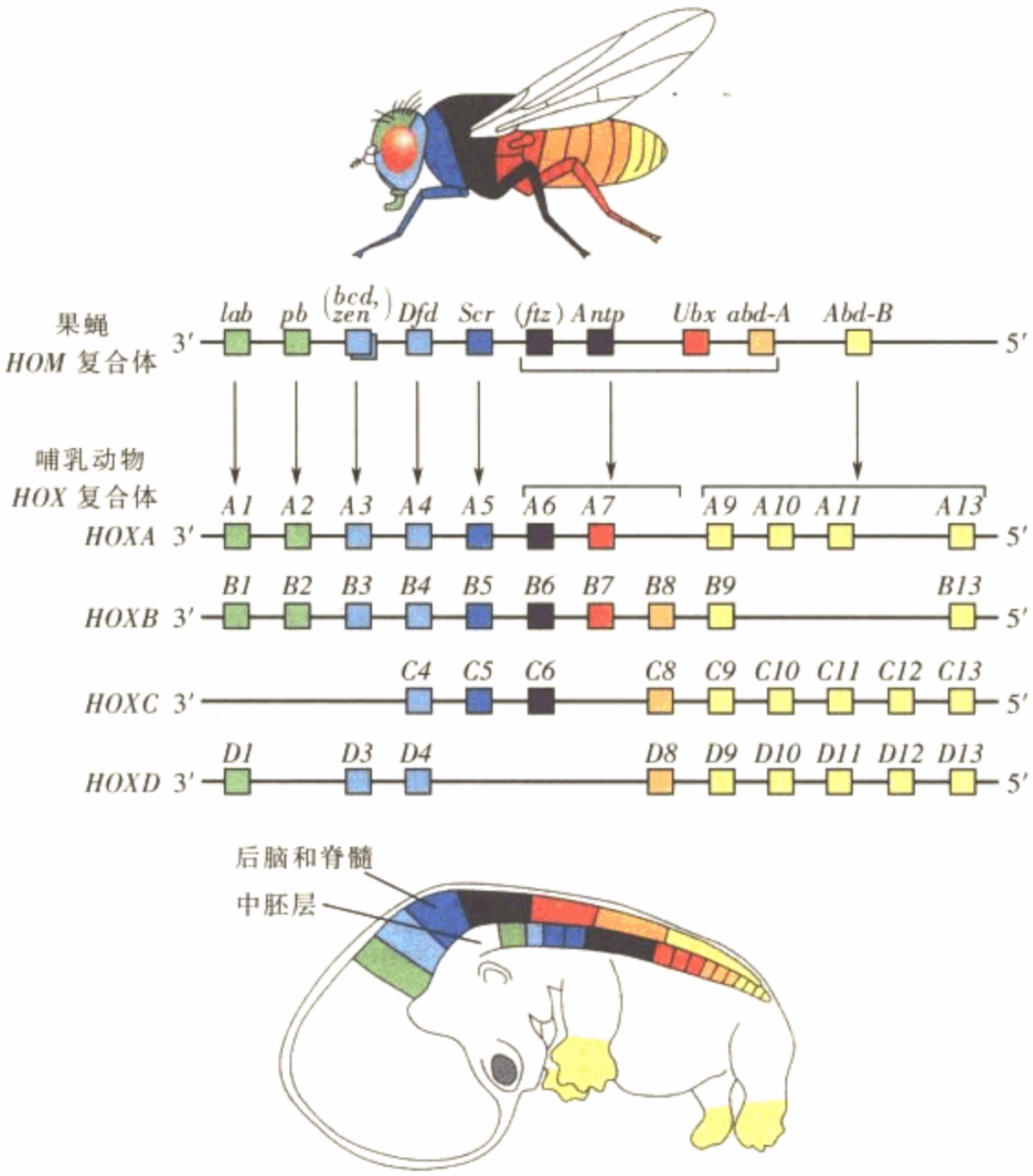
	1																	20
小鼠 *HOXa-4*	Ser	Lys	Arg	Gly	Arg	Thr	Ala	Tyr	Thr	Arg	Pro	Gln	Leu	Val	Glu	Leu	Glu	Lys	Glu	Phe
蛙 *XIHbOX2*	Arg	Lys	Arg	Gly	Arg	Gln	Thr	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Gln	Thr	leu	Glu	Leu	Glu	Lys	Glu	Phe
果蝇 *ANTP*	Arg	Lys	Arg	Gly	Arg	Gln	Thr	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Gln	Thr	leu	Glu	Leu	Glu	Lys	Glu	Phe
果蝇 *FTZ*	Ser	Lys	Arg	Thr	Arg	Gln	Thr	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Gln	Thr	leu	Glu	Leu	Glu	Lys	Glu	Phe
果蝇 *UBX*	Arg	Arg	Arg	Gly	Arg	Gln	Thr	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Gln	Thr	leu	Glu	Leu	Glu	Lys	Glu	Phe
	21																	40
小鼠 *HOXa-4*	His	Phe	Asn	Arg	Tyr	Leu	Met	Arg	Pro	Arg	Arg	Val	Glu	Met	Ala	Asn	Leu	Leu	Asn	Leu
蛙 *XIHbOX2*	His	Phe	Asn	Arg	Tyr	Leu	Thr	Arg	Arg	Arg	Arg	Ile	Glu	Ile	Ala	His	Val	Leu	Cys	Leu
果蝇 *ANTP*	His	Phe	Asn	Arg	Tyr	Leu	Thr	Arg	Arg	Arg	Arg	Ile	Glu	Ile	Ala	His	Ala	Leu	Cys	Leu
果蝇 *FTZ*	His	Phe	Asn	Arg	Tyr	Ile	Thr	Arg	Arg	Arg	Arg	Ile	Glu	Ile	Ala	His	Ala	Leu	Ser	Leu
果蝇 *UBX*	His	Thr	Asn	His	Tyr	Leu	Thr	Arg	Arg	Arg	Arg	Ile	Glu	Met	Ala	Tyr	Ala	Leu	Cys	Leu
	41																	60
小鼠 *HOXa-4*	Thr	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Tyr	Lys	Lys	Asp	Gln
蛙 *XIHbOX2*	Thr	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Trp	Lys	Lys	Glu	Asn
果蝇 *ANTP*	Thr	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Trp	Lys	Lys	Glu	Asn
果蝇 *FTZ*	Ser	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Trp	Lys	Lys	Asp	Arg
果蝇 *UBX*	Thr	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Glu	Ile

●图 14-11　不同生物同源盒编码的氨基酸序列比较

目前认为，*HOM* 或 *Hox* 基因是一类非常重要的转录调节因子，其功能是将胚胎细胞沿前-后轴分为不同的区域，并决定各主要区域器官的形态建成。例如，果蝇 *HOM* 基因的功能是决定一组细胞发育途径的一致性，确保体节或肢芽的典型特点。当 *HOM* 基因突变时，可发生同源异形转变（homeosis），即一种结构转变为另一种同源结构（homologous structure），例如果蝇的第三胸节转变为第二胸节，形成像第二胸节一样的翅膀，这就是同源异形基因一词的由来。

果蝇的 *HOM* 基因位于 3 号染色体上，由两个独立的复合体组成，即触角足复合体和双胸复合体（bithorax complex），含有这两个复合体的染色体区域通常称为同源异型

复合体（homeotic complex，HOM-C）。由于进化，果蝇 *HOM* 基因在哺乳动物中出现了 4 次：*Hox-A*，*Hox-B*，*Hox-C*，*Hox-D*，分别定位于人的 7，17，12 和 2 号染色体；在小鼠则分别定位于 6，11，15 和 2 号染色体上。*HOM* 或 *Hox* 基因在染色体上的排列顺序与其在体内的不同时空表达模式相对应，即：这些基因激活的时间顺序表现为越靠近前部的基因表达越早，而靠近后部的基因表达较迟；这些基因表达的空间顺序表现为头区的最前叶只表达该基因簇的第一个基因，而身体最后部则表达基因簇的最后一个基因（图 14-12）。



●图 14-12　同源盒基因在果蝇和小鼠染色体上的排列顺序及基因表达的解剖顺序

数字与颜色表示跨越两种动物之间的结构相似性；基因的表达顺序与其在染色体上的排列顺序相对应，越靠近前部表达的基因转录越早

四、小 RNA 在细胞分化中的作用

小 RNA 是近些年发现的长度约在 20~30 个核苷酸（nt）的非编码 RNA（non-coding RNA），包括约 22nt 的微小 RNA（microRNA，miRNA）、21~28nt 的小干扰 RNA（small interferencing RNA，siRNA），以及最近在小鼠精子发育过程中发现的 26~31nt 的 piRNA（Piwi-interacting RNA）。miRNA 的前体为 70~90nt，由具有核糖核酸酶性质的 Drosha 和 Dicer 酶加工而成；siRNA 来源于外源性长的双链 RNA，是 Dicer 酶解产物。

起初，小 RNA 是在研究秀丽隐杆线虫（*C. elegan*）细胞命运的时间控制过程中被发

现的：高浓度的转录因子 LIN-14 可特异性地促进早期幼虫器官的蛋白质合成，但在后续的发育中，尽管体内一直存在 *lin-14* mRNA 却检测不到 LIN-14 蛋白。后来发现在线虫的第一、二龄幼虫期存在一个 22nt 的 miRNA，即 *lin-4* RNA。*Lin-4* RNA 通过与 *lin-14* mRNA 3′端 UTR 互补结合，短暂下调 LIN-14 蛋白水平，促进线虫从第一龄幼虫期向第二龄幼虫期发育。如果 *lin-4* 基因突变而失去功能，那么线虫幼虫体内可持续合成 LIN-14 蛋白，使线虫长期停滞在幼虫的早期发育阶段。2000 年在线虫体内又发现了另一个 miRNA—let-7 RNA。let-7 RNA 长为 21nt，存在于线虫的第三、四龄幼虫期及成虫期，其功能是决定线虫从幼虫向成虫的形态转变。后续研究发现，let-7 RNA 不仅存在于线虫，也存在于脊椎动物和人类。越来越多的研究资料表明，小 RNA 广泛地存在于哺乳动物，具有高度的保守性，它们通过与靶基因 mRNA 互补结合而抑制蛋白质合成或促使靶基因 mRNA 降解。小 RNA 的生物发生机制特别是其功能至今仍在研究中。已有许多研究表明，它们参与了细胞分化与发育的基因表达调控。

第三节　细胞分化的调节因素

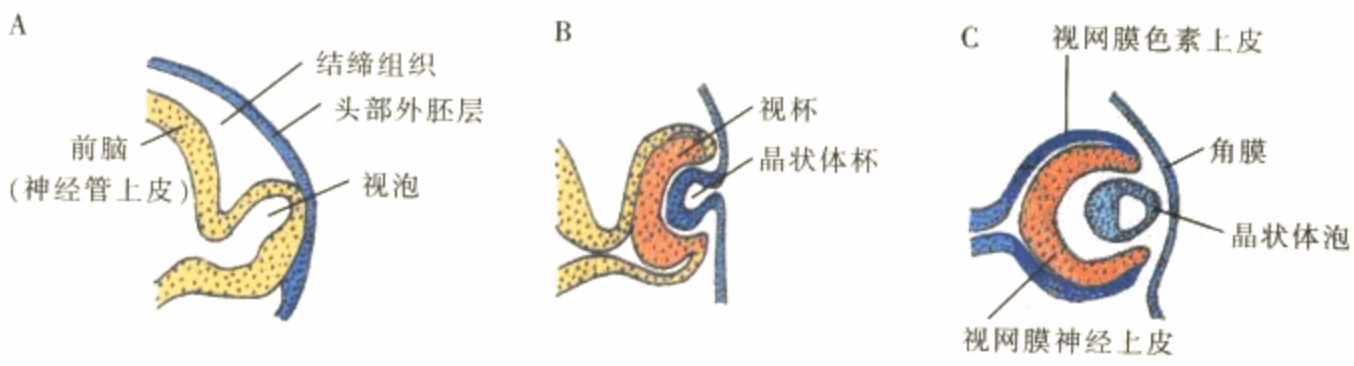
一、细胞间相互作用在细胞分化中的作用

在个体发育过程中，随着胚胎细胞数目的不断增加，细胞之间的相互作用对细胞分化的影响越来越重要。原肠胚以后，三个胚层的发育前途虽已确定，但各胚层进一步发育还有赖于细胞群之间的相互作用，这种作用可视为细胞外的因素对细胞分化的调节。胚胎细胞间的相互作用协调了细胞分化的方向。

（一）胚胎细胞间相互作用的主要表现形式是胚胎诱导

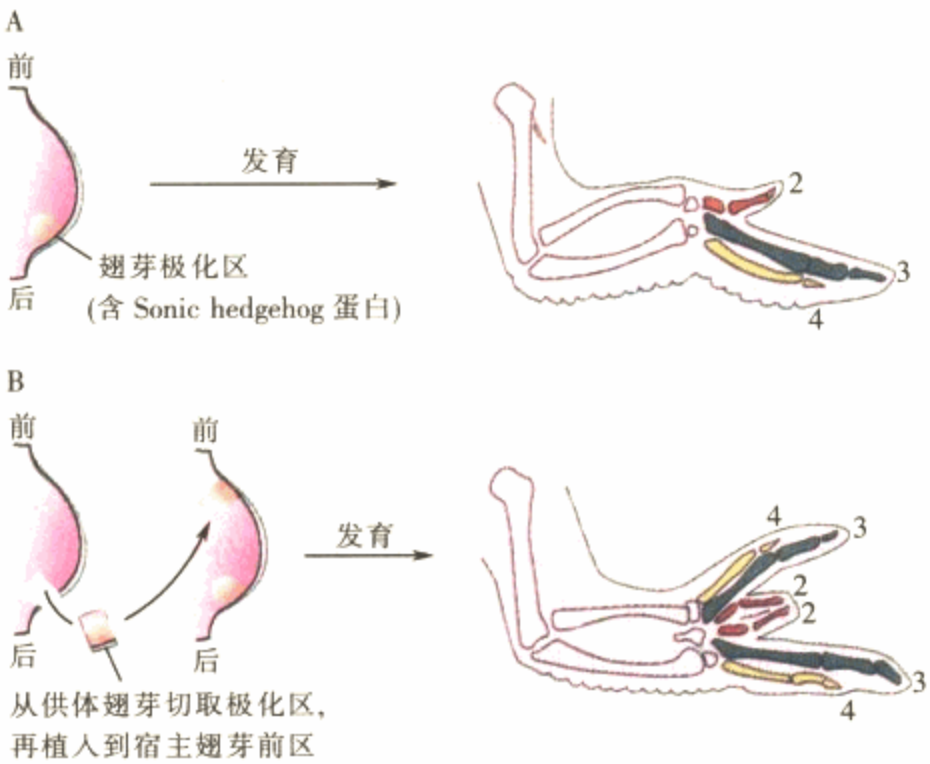
胚胎发育过程中，一部分细胞对邻近细胞产生影响并决定其分化方向的现象，称为诱导或胚胎诱导（embryonic induction）。起诱导作用的细胞或组织称为诱导细胞或诱导组织，被诱导而发生分化的细胞或组织称为反应细胞或反应组织。胚胎诱导现象最初是由Spemann 在胚胎移植（embryonic graft）实验过程中发现的，他因此获得了诺贝尔奖。

研究表明，胚胎细胞间的相互诱导作用是有层次的。在三个胚层中，中胚层首先独立分化，该过程对相邻胚层有很强的分化诱导作用，促进内胚层、外胚层各自向相应的组织器官分化。例如，中胚层脊索诱导其表面覆盖的外胚层形成神经板，这是初级诱导；神经板卷成神经管后，其前端进一步膨大形成原脑，原脑两侧突出的视杯诱导其上方的外胚层形成晶状体，此为次级诱导；晶状体又诱导覆盖在其上方的外胚层形成角膜，这为三级诱导（图 14-13）。不同胚层细胞通过这种进行性的相互作用实现胚胎细胞分化。个体发育过程中，胚胎诱导具有严格的区域特异性和发育时-空限制性。



●图 14-13　眼球发育过程中的多级诱导作用

为什么会发生胚胎诱导现象，胚胎诱导的分子基础是什么？研究表明，胚胎诱导是通过诱导组织释放的各种旁分泌因子（paracrine factor）实现的。这些旁分泌因子以诱导组织为中心形成由近及远的浓度梯度，它们与反应组织细胞表面的受体结合，将信号传递至细胞内，通过调节反应组织细胞的基因表达而诱导其发育和分化。发育过程中常见的旁分泌因子有：①成纤维细胞生长因子（fibroblast growth factor，FGF）；②Hedgehog 家族蛋白，脊椎动物中至少有三个果蝇 Hedgehog 基因同源体：shh（sonic hedgehog），dhh（desert hedgehog）和 ihh（indian hedgehog）；③Wnt 家族蛋白，为富含半胱氨酸的糖蛋白，在脊椎动物中至少有 15 个家族成员，其名称由 wingless 和 integrated 融合而成。wingless 为果蝇分节极性基因，integrated 是它的脊椎动物同源体；④TGF-β 超家族，由 30 多个结构相关的成员组成，包括 TGF-β 家族、活化素（activin）家族、骨形成蛋白（bone morphogenetic protein，BMP）家族及 Vgl 家族等。这些因子在胚胎的不同发育阶段以及处于不同位置的胚胎细胞中的表达差异，提供了胚胎发育过程中的位置信息。典型的例子是含有产生 sonic hedgehog 蛋白的胚胎细胞团的移植实验。原位杂交结果显示，sonic hedgehog mRNA 也存在于胚胎的翅芽中，但仅定位于将来发育为翅膀小趾的翅芽后部。如果把另一产生 sonic hedgehog 蛋白的翅芽后部细胞团移植到翅芽的前部，那么，在以后发育成的翅膀上将出现镜像的趾重复（图 14-14）。位置信息还表现在不同部位胚胎细胞对同一种旁分泌因子的分化效应不同，如 sonic hedgehog 蛋白诱导翅芽细胞发育为趾，而由脊索产生的 sonic hedgehog 蛋白则诱导邻近的神经管细胞分化成底板（floor plate）和运动神经元。



●图 14-14　位置信息（sonic hedgehog 信号）在翅膀发育中的作用

A. 正常翅芽的发育　B. Sonic hedgehog 的正常表达部位在翅芽后部极化区，将该极化区细胞移植到宿主翅芽的前区，则产生了额外的翅趾

表 14-1 总结了胚胎发育过程中常见旁分泌因子介导的信号转导通路，其中的 Delta 为跨膜蛋白，它与邻近细胞膜上的跨膜蛋白受体 Notch 直接作用而发挥诱导效应，这种需要相互作用细胞的细胞膜并置在一起的诱导现象被称为近分泌相互作用（juxtacrine

表 14-1　动物发育过程中常见胚胎诱导的信号通路

信号通路	配体家族	受体家族	细胞外抑制或调节因子
受体酪氨酸激酶	EGF	EGF 受体	Argos
	FGF(Branchless)	FGF 受体(Breathless)	
	ephrins	Eph 受体	
TGF-β 超家族	TGF-β	TGF-β 受体	chordin(Sog),noggin
	BMP(Dpp)	BMP 受体	
	Nodal		
Wnt	Wnt(Wingless)	Frizzled	Dickkopf,Cerberus
Hedgehog	Hedgehog	Patched,Smoothened	
Notch	Delta	Notch	Fringe

interaction）。

（二）胚胎细胞间的相互作用还表现为细胞分化的抑制效应

抑制是指在胚胎发育中已分化的细胞抑制邻近细胞进行相同分化而产生的负反馈调节作用。例如，把发育中的蛙胚置于含蛙心组织碎片的培养液中，胚胎将受到抑制不能产生正常的心脏。这说明，已分化的细胞可产生某种物质，抑制邻近细胞向其相同方向分化，这种物质称为抑素（chalone）。

另一种抑制现象表现为，在具有相同分化命运的胚胎细胞中，如果一个细胞“试图”向某个特定方向分化，那么，这个细胞在启动分化指令的同时也发出另一个信号去抑制邻近细胞的分化，这种现象被称为侧向抑制（lateral inhibition）。比如在脊椎动物的神经板细胞向神经前体细胞（neuronal precursor cell）分化过程中，尽管这些神经板细胞均有发育为神经前体细胞的潜能，但只有其中的部分细胞可发育为神经前体细胞，其余的则分化为上皮性表皮细胞。这种现象是由神经板细胞间的侧向抑制作用所决定的。正是由于有诱导分化和抑制分化的存在，才使胚胎发育有序地进行，使发育的器官间得以相互区别、避免重复。

二、激素对细胞分化的调节

激素是远距离细胞间相互作用的分化调节因子。在个体细胞分化与发育过程中，除相邻细胞间可发生相互作用之外，不相邻的远距离的细胞之间也可发生相互作用。与介导邻近细胞间相互作用的旁分泌因子不同，远距离细胞间的相互作用由经血液循环输送至各部位的激素来完成。激素所引起的反应是按预先决定的分化程序进行的，是个体发育晚期的细胞分化调控方式。激素可分为甾类激素和多肽类激素两大类：甾类激素如类固醇激素、雌激素和昆虫的蜕皮素等为脂溶性，分子小，可穿过靶细胞的细胞膜进入细胞质，与细胞质内的特异受体结合形成受体-激素复合物，该复合物入核后，能作为转录调控物，直接结合到 DNA 调控位点上激活（或在一些情况下抑制）特异基因的转录；多肽类激素如促甲状腺素、肾上腺素、生长激素和胰岛素等为水溶性，分子量较大，不能穿过细胞膜，而是通过与质膜上的受体结合，并经过细胞内信号转导过程将信号传递到细胞核，影响核内DNA 转录。如同许多其他的细胞内信号转导途径一样，这个过程包括蛋白激酶的顺序激活。

激素影响细胞分化与发育的典型例子是动物发育过程中的变态（metamorphosis）效应。所谓变态，是指动物从幼体变为在形态结构和生活方式上有很大差异的成熟个体的发育过程。例如，蝇类和蛾类等昆虫，其幼虫身体被一坚硬的角质层所覆盖，运动能力有限，它需要经过多次蜕皮才能成为在空中飞舞的成虫；在两栖类，只能在水中生活的有尾蝌蚪需经过变态发育才能形成可在陆地生活的无尾的蛙。研究表明，昆虫的变态发育受蜕皮激素的影响，而两栖类的变态则与甲状腺激素（T_3，T_4）有关。在哺乳动物和人类，乳腺的发育自胚胎期已开始，但直到青春期受雌激素的作用才开始迅速发育。

三、环境因素对细胞分化的影响

细胞分化的方向可因环境影响而改变。环境因素在调节或影响动物细胞分化与发育方面的研究越来越受到人们的重视。目前已了解到，物理的、化学的和生物性因素均可对细胞的分化与发育产生重要影响。在两栖类动物，其受精卵的背-腹轴决定除了取决于精子穿透进入卵的位点之外，还和重力的影响有关。在低等脊椎动物，性别决定与分化受环境

因素的影响较大，环境信号启动基因的表达不同，从而影响动物的性别。比如，孵化温度可以决定某些爬行动物（如鳄鱼）的性别，在其受精卵发育的一个特定时期，温度是性别分化的决定因子，在低温下孵化产生一种性别，在高温下孵化则产生另一种性别。而哺乳类动物（包括人类）B 淋巴细胞的分化与发育则依赖于外来性抗原的刺激。目前已发现许多环境因素可干扰人类的正常发育。例如，碘缺乏将引起甲状腺肿、精神发育和生长发育迟缓；在妊娠时感染风疹病毒易引起发育畸形，该病毒主要作用于胚胎的视觉器官和心脏，引起先天性白内障和心脏发育畸形。有关环境因素调控细胞分化与发育的机制也是目前生物医学研究的热点领域之一。该领域的深入研究，可望为环境有害物质引起的出生缺陷和发育畸形等提供新的干预靶点。

第四节　细胞分化与肿瘤细胞

肿瘤细胞是从生物体内正常细胞演变而来的，正常细胞转变为恶性肿瘤的过程称为癌变或恶性病变。临床上把具有恶性增殖和广泛侵袭转移能力的肿瘤细胞称为癌细胞。正常细胞一旦恶性变，它们的许多生物学行为，包括生化组成、形态结构和功能等都发生了显著的变化。肿瘤细胞是当前细胞生物学研究的一个重要领域。研究肿瘤细胞的分化特征以及肿瘤细胞的诱导分化不但能为肿瘤性疾病提供合理的治疗对策，而且有助于人们对正常细胞分化机制的认识。

一、肿瘤细胞的分化特征

肿瘤细胞和胚胎细胞具有许多相似的生物学特性，均呈现出未分化和低分化特点。肿瘤细胞除了具有其来源细胞的部分特性之外，主要表现出低分化和高增殖的特征。

（一）肿瘤细胞是异常分化的细胞

肿瘤细胞具有某些其来源组织细胞的分化特点，但更多见的是缺少这种特点，甚至完全缺如。高度恶性的肿瘤细胞，其形态结构显示迅速增殖细胞的特征，细胞核大、核仁数目多，核膜和核仁轮廓清楚。电镜下的超微结构特点是，细胞质呈低分化状态，含有大量的游离核糖体和部分多聚核糖体；内膜系统，尤其是高尔基复合体不发达；微丝排列不够规则；细胞表面微绒毛增多变细；细胞间连接减少。分化程度低或未分化的肿瘤细胞缺乏正常分化细胞的功能，如胰岛细胞瘤可无胰岛素合成，结肠肿瘤可不合成黏蛋白，肝癌细胞不合成血浆白蛋白等。

从细胞分化观点分析肿瘤，认为分化障碍是肿瘤细胞的一个重要生物学特性，甚至有人认为肿瘤本身是一种分化疾病，是由于正常基因功能受控于错误的表达程序所致。包括人类在内的复杂的多细胞生物，需要胚胎细胞分化为各种具有特殊功能的细胞，并进一步组成各种组织和器官。分化是一个定向的，严密调节的程序控制过程，其关键在于基因按一定的时空顺序有选择地被激活或抑制。多数情况下，终末分化细胞不再具有增殖能力，而肿瘤细胞在不同程度上缺乏分化成熟细胞的形态和完整的功能，丧失某些终末分化细胞的性状，并常对正常的分化调节机制缺乏反应。因此，Pierce 等提出，恶性肿瘤是细胞分化和胚胎发育过程中的一种异常表现，这一见解对于理解肿瘤细胞起源和本质特征具有重要意义。

（二）肿瘤细胞是丧失接触性抑制的“永生”细胞

一般情况下，体外培养的大部分正常细胞需要黏附于固定的表面进行生长（依赖锚泊），增殖的细胞达到一定密度，汇合成单层以后即停止分裂，此过程称为接触抑制或密度依赖性抑制。而肿瘤细胞和转化细胞则缺乏这种生长限制，甚至可在半固体琼脂中呈悬

浮生长，不需要依附于固定表面，不受密度限制，可持续分裂，达到很高密度而出现堆积生长，形成高出单层细胞的细胞灶。正常二倍体细胞的培养基中必须含有一定浓度的血清（5%以上）才能维持培养细胞分裂增殖。肿瘤细胞或转化细胞的生长对生长因子或血清的依赖性降低，甚至在缺乏生长因子或低血清（2%）状态下也可生长、分裂，这可能涉及几种机制：①肿瘤细胞能合成、分泌自身生长所需的生长因子（自分泌）；②肿瘤细胞所表达的一些受体异常增高，这样即使配体浓度非常低，也将有很大的活性；③与细胞增殖相关的信号传导途径异常，这与基因突变有关。此外，人类正常细胞在体外培养传代一般不能超过 50 次，而恶性肿瘤细胞则可以无限传代成为“永生”的细胞系。

在体内，肿瘤细胞不但增殖失控形成新的肿块，而且侵袭破坏周围正常组织，进入血管和淋巴管中，转移到身体其他部位滋生继发性的肿瘤，这些继发性的肿瘤再侵袭和破坏植入部位的组织。肿瘤细胞在宿主体内广泛地散播，而宿主却缺乏阻止它生长的有效机制，这使得恶性肿瘤成为高度危险并难以治愈的疾病，最终导致患者死亡。肿瘤细胞的这些特征与胚胎细胞具有共性，比如胚胎细胞的迁移特性。

恶性肿瘤细胞普遍具有分化障碍，它们停滞在分化过程的某一阶段。但并非所有肿瘤细胞的分化都很差，有些相对较好。恶性肿瘤细胞的本质是增殖分化失去控制，正常程序化的增殖分化机制丧失。

二、肿瘤细胞的分化起源

绝大多数肿瘤呈单克隆生长的特性，说明肿瘤中的全部细胞都来源于同一个恶变细胞。根据生长动力学原理，肿瘤细胞群体大致可分为四种类型：①干细胞，它是肿瘤细胞群体的起源，具有无限分裂增殖及自我更新能力，维持整个群体的更新和生长；②过渡细胞，它由干细胞分化而来，具备有限分裂增殖能力，但丧失自我更新特征；③终末细胞，它是分化成熟细胞，已彻底丧失分裂增殖能力；④G_0 期细胞，它是细胞群体中的后备细胞，有增殖潜能但不分裂，在一定条件下，可以更新进入增殖周期。其中肿瘤干细胞在肿瘤发生、发展中起关键作用。

大量证据表明，肿瘤起源于一些未分化或微分化的干细胞，是由于组织更新时所产生的分化异常所致。组织更新存在于高等生物发育的各个时期。在成年生物组织如骨髓等，存在着未分化干细胞。干细胞的增生和分化使衰老和受损的组织、细胞更新或恢复，这些正常干细胞常是恶性变的靶细胞。肿瘤起源于未分化或微分化干细胞的直接证据来自小鼠的畸胎瘤（teratocarcinoma）实验：将 12 天胚龄的小鼠胚胎生殖嵴移植到同系成年小鼠睾丸被膜下，移植 17 天后，发现 80%的睾丸有胚胎性癌细胞病灶，并且很快发展成典型畸胎瘤细胞。胚胎性癌细胞形态上非常类似原始生殖细胞，都具有未分化的细胞质；同时，将早期发育阶段的胚胎包括受精卵移植至同系成年小鼠睾丸被膜下，也获得畸胎瘤。受精卵、原始生殖细胞都处于相同的未分化状态，因此，正常未分化生殖干细胞是畸胎瘤的起源细胞。白血病的发生也遵循这一规律，它起源于未分化或微分化的干细胞。这种认识可从白血病细胞免疫表型、免疫球蛋白和 T 细胞受体（TCR）基因分析及其与正常造血干细胞发育、分化比较中找到依据。上皮细胞作为由干细胞自我更新的组织和细胞类型更容易发生癌变。据统计，目前人类肿瘤的 90%以上是上皮源性的，这是因为上皮包含有许多分裂中的干细胞，易受到致癌因素的影响发生突变，转化为癌细胞。

在正常组织更新过程中，致癌因素如放射线、化学致癌物等可作用于任何能合成 DNA 的正常干细胞，而受累细胞所处的分化状态可能决定了肿瘤细胞的恶性程度。一般认为，受累细胞分化程度越低所产生的肿瘤恶性程度越高；反之，若受累细胞分化程度越

高，所产生肿瘤恶性程度越低，甚至只产生良性肿瘤。仍以小鼠畸胎瘤为例，若将 12.5~13 天的小鼠胚胎生殖嵴作异位移植，可致畸胎瘤，而将 13.5 天的生殖嵴作同样的异位移植，则丧失致畸胎瘤的能力，说明分化程度不同的细胞会产生截然不同的结果。

三、肿瘤细胞向正常细胞的诱导分化

越来越多的研究表明，肿瘤细胞可以在高浓度的分化信号诱导下，增殖减慢，分化加强，走向正常的终末分化。这种诱导分化信号分子称为分化诱导剂，它可以是体内的或人工合成的。分化诱导剂对肿瘤的这种促分化作用，称为分化诱导作用。

20 世纪 70 年代，人们开始发现肿瘤细胞的诱导分化现象，先后发现细胞膜的环磷酸腺苷（cAMP）衍生物，如环丁酰 cAMP、8-溴 cAMP 可使神经母细胞瘤的某些表型逆转，二甲基亚砜（DMSO）在体外可使小鼠红白血病细胞发生部分分化。继而有人用微量注射法将小鼠睾丸畸胎瘤细胞注入小鼠囊胚，经培养后植入假孕的雌鼠子宫，结果生出“正常的小鼠”。这证明恶性肿瘤细胞在某些物质作用下可以改变其生物学性状，使恶性增殖得到控制。但是，这些结果仅适用于实验研究而无临床应用价值。

20 世纪 80 年代，T. R. Breitman 利用原代细胞培养实验，发现维生素 A 衍生物——维甲酸对人急性早幼粒细胞白血病具有诱导分化作用，并在两例 M_3 型病人中观察到疗效。Flynn 使用 13-顺维甲酸治疗病人取得成功。我国学者应用全反式维甲酸治疗急性早幼粒细胞白血病在大样本病例中获得成功，证明全反式维甲酸可诱导白血病细胞沿着粒细胞系进行终末分化。后来的研究相继证实，许多细胞因子、小剂量的化疗药物都具有诱导分化作用。至 20 世纪 90 年代，随着肿瘤外科手术治疗、化疗和放疗取得的成就，肿瘤的诱导分化治疗也从实验室走向临床。

目前，诱导分化治疗的研究与观察已涉及多种人类肿瘤，如结肠癌、胃癌、膀胱癌、肝癌等。但不同肿瘤细胞可有多种分化诱导剂，并有相对的专一性，其中研究及治疗最深入的是全反式维甲酸对人急性早幼粒细胞白血病的诱导分化治疗。虽然诱导分化治疗仅在这单一病种上最为成功，但其意义重要。它揭示了一个肿瘤治疗的方向，即通过诱导肿瘤细胞分化来实现肿瘤细胞的“改邪归正”，改变肿瘤细胞恶性生物学行为，达到治疗的目的。

第五节　细胞分化与再生

一些发育成熟的成年动物个体有再生（regeneration）现象，表现为动物的整体或器官受外界因素作用发生创伤而部分丢失时，在剩余部分的基础上又生长出与丢失部分在形态结构和功能上相同的组织或器官的过程。机体在正常生理条件下由组织特异性成体干细胞完成的组织或细胞的更新，如血细胞的更新、上皮细胞的脱落和置换等，虽然与再生相似，但性质上有所不同。不同动物的再生能力有显著差异。一般来说，高等动物的再生能力低于低等动物，脊椎动物低于无脊椎动物，而哺乳动物的再生能力很低，仅限于肝脏等少数器官。为什么有的动物能够再生，有的动物不能，再生过程的机制是怎样的？阐明这些问题具有重要的医学意义。

一、再生的本质与方式

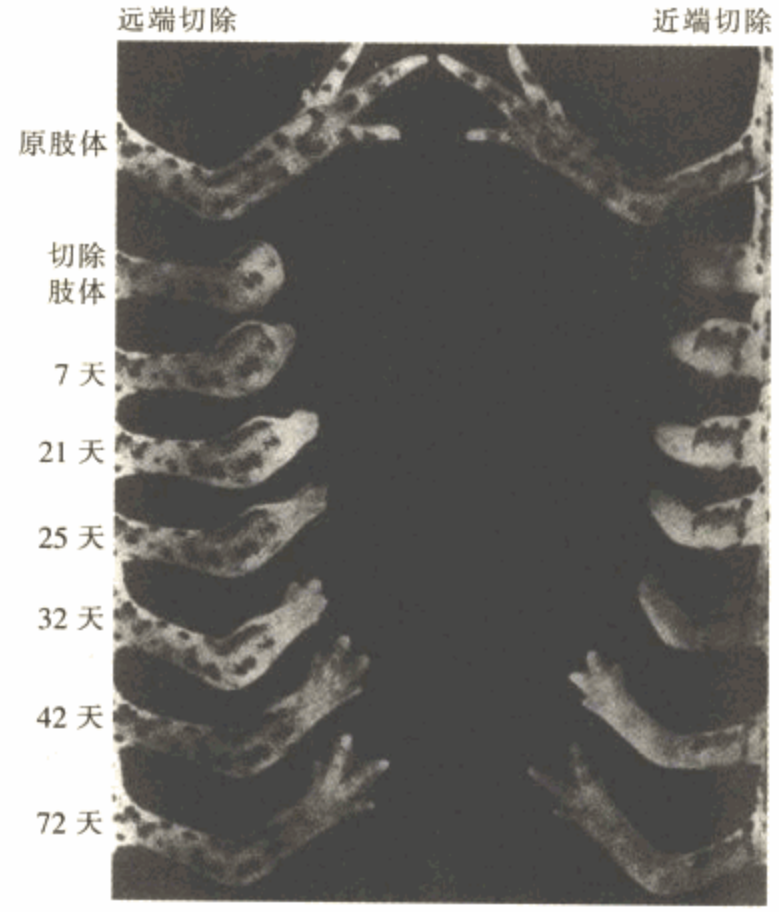
现有研究资料表明，再生的本质是成体动物为修复缺失组织器官的发育再活化，是多潜能未分化细胞的再发育。再生方式主要有三种：第一种方式是成体组织通过去分化过程

形成未分化的细胞团，以便之后可以重新分化，这种形式的再生称为微变态再生（epimorphosis regeneration），是两栖类动物再生肢体的主要方式；第二种称为变形再生（morphallaxis regeneration），这种再生通过已存在组织的重组分化，即组织中的多潜能未分化细胞的再分化和部分细胞的转分化来进行，比如水螅的再生；第三种再生是一种中间形式，被认为是补偿性再生（compensatory regeneration），表现为细胞分裂，产生与自己相似的细胞，保持它们的分化功能，这是哺乳动物肝脏再生的方式。

二、再生的过程

人们在两栖类有尾动物蝾螈（*Salamander*）的肢体再生上进行了较为深入的研究。在此以蝾螈肢体再生为例来说明再生的变化过程。

当一只成体蝾螈的肢体被切除后，剩余的细胞可以重建一只完整的肢体。例如，当手腕被切除后，蝾螈会长出一只新的手腕而不是新的肘。蝾螈的肢体“知道”远-近端轴的何处受伤并且能够从那个地方开始再生。蝾螈肢体的再生主要包括以下几个过程（图 14-15）：



●图 14-15　蝾螈肢体的切除再生

1. 顶端外胚层帽和去分化再生胚芽的形成　肢体切除后，在 6~12 小时之内，来自剩余截面的表皮细胞迁移来覆盖创面，形成创面表皮（wound epidermis）。这种单层细胞结构对于肢体的再生是必需的，它通过增殖而形成顶端外胚层帽（apical ectodermal cap）。因此，与哺乳动物的创面愈合相对比，它没有瘢痕的形成，因为有表皮来覆盖截面。在随后的 4 天里，顶端外胚层帽下面的细胞经历了戏剧性的去分化：骨细胞、软骨细胞、成纤维细胞、肌细胞失去了它们的分化特性，其中在分化组织中表达的基因，例如在肌细胞中表达的 *MRF4* 和 *myf5* 基因被下调，而与胚胎样肢体的区域间充质增生过程有关的基因如 *msxl* 的表达则明显的升高了。由此在截面处的肢体组织区域形成了在顶端外胚层帽之下的不能辨别的去分化的细胞增殖团块，称为再生胚芽（regeneration blastema），其中的细胞称为胚芽细胞。

2. 胚芽细胞的增生和再分化　胚芽细胞的增生依赖于神经的存在，因为神经元能释放刺激胚芽细胞增殖的有丝分裂刺激因子。在胚芽中存在神经胶质生长因子（glial growth factor，GGF），去除神经支配后则检测不到 GGF，当这种多肽加入到去除神经支配的胚芽中后，有丝分裂中止的细胞又能够再次分裂。此外，成纤维细胞生长因子、转铁蛋白（transferrin）等也在胚芽细胞增殖中起重要作用。胚芽细胞在经过分裂增殖之后即开始再分化，肌细胞开始合成肌蛋白，软骨细胞分泌软骨基质，等等，直至形成与原来肢体相同的新结构。

3. 再生胚芽的模式形成　再生胚芽在很多方面与肢体正常发育区域的肢芽相似。残肢和再生组织之间的腹-背轴和前-后轴是一致的，细胞和分子水平的研究证实了肢体再生与正常发育的机制十分相似。通过把再生肢体胚芽移植到发育中的肢体芽上，证明了胚芽细胞可对肢体芽的信号产生反应并有助于肢体发育。正如信号分子 Sonic hedgehog 被发现存在于

肢芽发育区域间充质的后区一样，Sonic hedgehog 也存在于早期再生胚芽的后部区域。

研究发现，再生肢体的受伤上皮和顶端外胚层帽细胞合成了视黄酸（retinoic acid），并沿胚芽的远-近轴呈现一个浓度梯度。视黄酸的这种梯度被认为是沿着胚芽有差别地激活一些基因的表达，如“通知”细胞在肢体中所处位置和所需生长数量的 *Hox* 基因，结果导致再生肢体的形态分化。

三、再生的医学意义

除肝脏之外，人类不会再生器官，至多在儿童期还可以再生指尖，但是至成人期就丧失了这种能力。由于再生损伤组织在医学上的重要性，许多生命科学工作者根据低等生物的再生机制，试图找出激活人体器官形成的发育程序的方法。其中一种方法是寻找相对未分化的多潜能干细胞；另外一种方法是寻找能够允许这些细胞开始形成特定组织细胞的微环境。迄今在寻找未分化的多潜能干细胞方面已取得了长足进展（详见第十七章）。可以确信，随着对发育机制研究的不断深入，真正实现按照人们的意愿去再生组织器官，以达到彻底修复和替代病变器官的愿望将会逐渐变为现实。

小结

细胞分化是多细胞生物个体发育的核心事件。细胞分化机制的研究对于阐明生命的奥秘、推动医学的发展具有重要意义。

在个体发育过程中，细胞分化的潜能由“全能”到“多能”再到“单能”。细胞分化的方向由细胞决定所选择。已分化的细胞通常是稳定的，但在特定条件下也可发生转分化，从而成为在形态结构和功能上不同于原来的细胞。

细胞分化的分子基础是基因的选择性表达，母源效应基因产物的极性分布和胚胎发育早期细胞的不对称性分裂决定或影响细胞的分化命运。细胞分化的基因表达调控主要发生在转录水平：细胞内组织特异性转录因子和活性染色质结构的特异调控区决定了分化细胞的特异性蛋白表达；细胞分化主导基因可启动特定谱系细胞的分化；DNA 甲基化将导致基因表达的沉默；组蛋白的乙酰化则有利于基因的转录；高度保守的 *Hox* 基因是同源盒基因家族的主要成员，在机体前-后轴结构的形成和分化过程中起重要作用。

细胞分化受多种因素的调节。随个体发育进程，不断增加的胚胎细胞间的相互作用对细胞分化的影响越来越明显，其主要表现形式是由旁分泌因子和细胞间位置信息所介导的胚胎诱导；而激素则是个体发育晚期细胞分化的调节因素。

肿瘤细胞和胚胎细胞间具有许多相似的生物学特性。肿瘤细胞的典型特点是细胞增殖失控和分化障碍，可视为细胞的异常分化状态。恶性肿瘤可以向正常成熟细胞诱导分化。

低等动物能再生缺损器官，其本质是缺损器官处的成体细胞能够去分化为未分化细胞。再生是个体发育的再活化。

由一个受精卵分化来的细胞为什么会变得如此多样与丰富多彩？这一问题，数百年来虽经许多生命科学家前赴后继的工作，但至今仍不清楚。克隆羊的诞生，人胚胎干细胞的建系，孤雌生殖老鼠的出现以及基因打靶技术的有效应用等，成为近年来细胞分化研究领域的亮点，并正在向彻底修复疾病的再生医学等领域迈进。

（陈誉华）

第十五章　细胞衰老与细胞死亡

在高等动物，大多数机体细胞都经历了由未分化到分化、分化到衰老、衰老到死亡的过程。生物体内每时每刻都有细胞在衰老、死亡，同时又有增殖和新生的细胞进行补偿。细胞衰老与细胞死亡是生物界的普遍规律，是一种不可抗拒的生理现象。人体内有200多种细胞，它们的寿命各不相同，例如，红细胞的寿命仅为120天，肝细胞的寿命约18个月，神经元的寿命与机体寿命大致相同。阐明这些细胞的衰老与死亡的机制，对于揭示生命的奥秘和延缓个体的衰老具有重要的意义。细胞衰老与细胞死亡的机制研究一直是细胞生物学研究领域的重要课题。

第一节　细 胞 衰 老

一、细胞衰老的概念

细胞衰老（cellular aging 或 cell senescence）是指细胞在正常条件下发生的细胞的生理功能衰退和增殖能力减弱，以及细胞形态发生改变并趋向死亡的现象。细胞衰老是机体的衰老和老年病发病的基础。

（一）细胞衰老与机体的衰老既有区别又有联系

机体衰老是指绝大多数生物性成熟以后，机体形态结构和生理功能逐渐退化或老化的过程，是一个受发育程序、环境因子等多种因素控制的、不可逆的生物学现象，机体的衰老与动物的寿命密切相关。对多细胞生物来说，细胞的衰老与机体的衰老是两个不同的概念。个别细胞，甚至机体局部许多细胞的衰老死亡并不影响机体的寿命；同样，机体衰老并不代表所有细胞的衰老，如70岁老人的生精细胞仍可以活跃地发生。同时，机体衰老与细胞衰老之间又有着密切的联系。个体的衰老是建立在总体细胞衰老的基础上的，各种衰老都有其细胞学基础，如老年人运动功能衰退与其体内的运动神经元的衰老和死亡密切相关。细胞是组成生物有机体的基本结构和功能单位，也是机体衰老的基本单位。因此，机体衰老是以细胞总体的衰老为基础的，细胞总体的衰老反应了机体的衰老。

（二）机体内各类细胞的寿命不同

生物体内总有细胞不断地衰老与死亡，同时又有细胞的增殖与新生进行补充。这不仅发生在胚胎发育过程中，在成年体内的各组织器官中也有细胞的衰老死亡。不同类型细胞的寿命很不一致。根据细胞寿命情况将细胞分为三类：第一类细胞的寿命接近于动物的整体寿命，如神经元、脂肪细胞、肌细胞等。第二类是缓慢更新的细胞，其寿命比机体的寿命短，如肝细胞、胃壁细胞等。第三类是快速更新且寿命较短的细胞，如皮肤的表皮细胞、红细胞和白细胞等。一般情况下，体内更新较快的细胞，其寿命较短；体内基本不更新的细胞，在分化成熟后可以保持与机体相同的寿命。细胞寿命除与细胞的种类有关，也受到内、外环境条件的影响。

（三）细胞在体外培养条件下的寿命

离体（in vitro）细胞同在体（in vivo）细胞一样，也有一定的寿命。对于体外培养的细胞，其寿命长短取决于培养细胞的平均代数，并与所取培养组织的年龄、种属等特性密

切相关。1961 年，Leonard Hayflick 首次报道了体外培养的人成纤维细胞（fibroblast）具有增殖分裂的极限，即 Hayflick 界限（Hayflick life span）。他利用来自胚胎和成体的成纤维细胞进行体外培养，发现胚胎的成纤维细胞分裂传代 50 次后开始衰老和死亡，而来自成年组织的成纤维细胞只能培养 15~30 代就开始死亡。Hayflick 等还发现，动物体细胞在体外可传代的次数，与物种的寿命有关；细胞的分裂能力与个体的年龄有关，由于上述规律最初是 Hayflick 研究和发现的，故称为 Hayflick 界限。

二、细胞衰老的表现

细胞衰老的主要表现是对环境变化的适应能力，以及维持细胞内环境稳定的能力降低。这些都是以细胞的形态结构和生化方面的改变为基础的。

（一）细胞衰老伴随着形态学改变

衰老细胞的形态变化主要表现在细胞皱缩，膜通透性和脆性增加，核膜内陷，细胞器数量特别是线粒体数量减少，胞内出现脂褐素等异常物质沉积，最终将出现细胞凋亡或坏死。总体来说衰老细胞的各种结构呈退行性变化（表 15-1）。

（二）细胞衰老过程中有生物大分子的改变

衰老细胞会出现脂类、蛋白质和 DNA 等细胞成分损伤，细胞代谢能力降低，主要表现在以下方面：①DNA：复制与转录受到抑制，但也有个别基因会异常激活，端粒 DNA 丢失，线粒体 DNA 特异性缺失，DNA 氧化、断裂、缺失和交联，甲基化程度降低。②RNA：mRNA 和 tRNA 含量降低。③蛋白质：含量下降，细胞内蛋白质发生糖基化、氨甲酰化、脱氨基等修饰反应，导致蛋白质的稳定性、抗原性和可降解性下降，自由基使蛋白质肽键断裂，交联而变性。氨基酸由左旋变为右旋。④酶分子：活性中心被氧化，金属离子 Ca^{2+}、Zn^{2+}、Mg^{2+}、Fe^{2+}等丢失，酶分子的二级结构、溶解度和等电点发生改变，总的效应是酶失活。⑤脂类：不饱和脂肪酸被氧化，引起膜脂之间或与脂蛋白之间交联，膜的流动性降低。

表 15-1　衰老细胞的形态变化

细胞组分	形 态 变 化
核	增大、染色深、核内有包含物
染色质	凝聚、固缩、碎裂、溶解
质膜	黏度增加、流动性降低
细胞质	色素积聚、空泡形成
线粒体	数目减少、体积增大、mtDNA 突变或丢失
高尔基体	碎裂
尼氏体	消失
包含物	糖原减少、脂肪积聚
核膜	内陷

三、细胞衰老的学说与机制

由于衰老是一个十分复杂的生命现象，又受到多种因素包括环境因素和体内因素的影响，任一角度的阐述都难以使衰老机制得到圆满解释，因而仍未形成较为一致的观点。目前，尽管关于细胞衰老的机制仍然是假说众多，但有关衰老的分子研究还是取得了较多进展。

（一）遗传决定学说认为衰老是遗传上的程序化过程

该学说认为衰老是遗传上的程序化过程，其推动力和决定因素是遗传的基因组；控制生长发育和衰老的基因都在特定时期有序地开启和关闭。在人类，有两个典型的例

子：一个是婴幼儿早衰症（Hutchinson-Gilford syndrome），患儿很早就出现明显的衰老症状（图 15-1），12~18 岁即过早夭折，该病是由于编码核膜蛋白的基因突变所引起的，为常染色体隐性遗传疾病；另一个是成人早衰症（Werner's syndrome），病人平均 39 岁时出现衰老，47 岁左右生命结束。体外培养的成人早衰症患者的成纤维细胞与正常人的成纤维细胞相比，只分裂了较少的次数就发生了衰老和死亡，人们发现引起该病的基因与 DNA 的解旋有关（患者的 DNA 不能够正常修复）。这些都促使人们推测，衰老在一定程度上是由遗传决定的。

●图 15-1　早衰儿童（不足 8 岁就表现出衰老特征）
（引自 Gilbert S. F.，2006）

（二）自由基学说认为活性氧基团导致细胞损伤和衰老

自由基是指那些在原子核外层轨道上具有不成对电子的分子或原子基团。所谓未成对电子，是指在原子或分子轨道中未与其他电子配对而独占一个轨道的电子。如 A、B 两个原子各提供一个电子通过共价键形成一个分子 A：B，这两个电子是配对的。如果在化学反应中发生了均裂，A 和 B 各带走一个电子，它们就是未成对电子。A·和·B 就称为自由基。

$$A:B \rightarrow A\cdot + \cdot B$$

在正常条件下，人体内自由基的产生有两方面：一是环境中的高温、辐射、光解、化学物质等引起的外源性自由基；二是体内各种代谢反应产生的内源性自由基。内源性自由基是人体自由基的主要来源，其产生的主要途径有：①由线粒体呼吸链电子泄漏产生；②由经过氧化物酶体的多功能氧化酶（MFO）等催化底物羟化产生。此外，机体血红蛋白、肌红蛋白中还可通过非酶促反应产生自由基。自由基是一类高度活化的分子，当这种分子与其他物质反应时，力图得到电子，而对细胞及组织产生十分有害的生物效应。由于自由基活性强，容易与细胞内的生物大分子发生反应，过多的自由基会对许多细胞组分造成损伤。它们能使质膜中的不饱和脂肪酸氧化，从而使膜内酶活性破坏、膜蛋白变性、膜脆性增加、膜结构发生改变，因而膜的运输功能紊乱甚至丧失；它们还能将蛋白质中的巯基氧化而造成蛋白质发生交联、变性，使酶失活；另外它们还能使 DNA 链断裂、交联、碱基羟基化、碱基切除等，从而对 DNA 造成损伤。有人认为在衰老的原因中，99%是由自由基造成的。老年人皮肤上的老年斑（age spots）就是自由基对细胞破坏的见证。

（三）端粒钟学说认为端粒随细胞分裂不断缩短为衰老的主要原因

端粒（telomere）是染色体末端的一种特殊结构，其 DNA 由简单的串联重复序列组成。人的染色体端粒由 TTAGGG/CCCTAA 重复序列组成。在细胞分裂过程中，由于端粒不能为 DNA 聚合酶完全复制而逐渐变短，除非有端粒酶的存在。端粒酶是一种由 RNA 和蛋白质组成的核糖核蛋白酶，常见于生殖细胞和肿瘤细胞等细胞中，而正常的体细胞中则缺乏端粒酶或端粒酶活性很低。

1990 年，C. Harley 等用人工合成的 $(TTAGGG)_3$ 作为探针，测定了不同年龄段的人成纤维细胞中的端粒长度，结果发现端粒长度随年龄增长而下降；在体外培养的成纤维细胞中，端粒长度也随分裂次数的增加而下降。在这些研究的基础上形成了细胞衰老的“有丝分裂钟”学说，或称“端粒钟（telomere clock）”学说。该学说认为，端粒随细胞的分裂

不断缩短，当端粒长度缩短到一定阈值时，细胞就进入衰老过程。1998 年，W. E. Wright 等人提供了更令人信服的证据。他们将人的端粒反转录酶亚基（hTRT）基因通过转染，引入正常的人二倍体细胞（人视网膜色素上皮细胞和成纤维细胞），发现表达端粒酶的转染细胞分裂旺盛，端粒长度明显增加，作为细胞衰老标志的 β-半乳糖苷酶活性则明显降低，这些与对照细胞存在鲜明的差异，而且表达端粒酶的细胞寿命比正常细胞至少长 20 代，且其核型正常。此外，对提前衰老的克隆羊“Dolly”的研究发现，其细胞中端粒的长度较同龄羊缩短 20%。这些研究表明，端粒长度的确与衰老有着密切的关系。然而一些研究并不支持这一学说。后续研究发现，在二倍体的仓鼠胚细胞分裂的各个阶段，细胞始终表达端粒酶，其端粒长度亦保持恒定，然而经过 20~30 代的分裂后，细胞仍然进入衰老。另外，某些小鼠终生保持较长的端粒，但并未因此获得较长的寿命。特别是剔除端粒酶基因的小鼠，在其前 5 代中，并未观察到相应的表型变化（如寿命缩短）。所以，衰老的“端粒钟学说”还需要经受更多的检验。

（四）细胞代谢废物累积可引起细胞衰老

代谢废物累积（waste product accumulation）学说是指由于细胞功能下降，细胞一方面不能将代谢废物及时排出胞外，另一方面又不能将其降解与消化，这样代谢废物越积越多，在细胞中占据的空间越来越大，影响细胞代谢废物的运输，以致阻碍了细胞的正常生理功能，最终引起细胞的衰老。哺乳动物脂褐质的沉积是一个典型的例子，脂褐质是一些长寿命的蛋白质和 DNA、脂类共价缩合形成的巨交联物，次级溶酶体是形成脂褐质的场所，由于脂褐质结构致密，不能被彻底水解，又不能排出细胞，结果在细胞内沉积增多，阻碍细胞的物质交流和信号传递，最后导致细胞衰老。又如老年性痴呆就是由 β-淀粉样蛋白沉积引起的，因此 β-淀粉样蛋白可做为老年性痴呆的鉴定指标。

（五）基因转录或翻译差错导致细胞衰老

随着年龄的增长，机体的细胞内不但 DNA 复制效率下降，而且常会发生核酸、蛋白质、酶等大分子的合成差错，这种与日俱增的差错最终引起细胞功能降低，并逐渐导致细胞衰老、死亡，这就是细胞衰老的基因转录或翻译差错学说。

（六）其他学说

除了上述学说外，还有“神经免疫网络论”、“钙调蛋白学说”、“微量元素学说”等。总之，细胞衰老的原因及其机制是非常复杂的，虽然关于衰老的研究已引起人们广泛的关注，近年来对其分子机制的探讨也取得了一些突出的、很有意义的成果，但要真正揭示衰老的机制和本质，显然还有很长的一段路要走。

第二节　细 胞 死 亡

细胞死亡是指细胞生命现象的终结，有两种形式：细胞坏死和细胞凋亡。细胞坏死指在外来致病因子作用下，细胞生命活动被强行终止所致的病理性、被动性的死亡过程。细胞凋亡指在特定信号诱导下，细胞内的死亡级联反应被触发所致的生理或病理性、主动性的死亡过程。细胞坏死只发生于病理情况下，如创伤、缺血、缺氧等。细胞凋亡多发生于生理情况下，也可发生在病理情况下。近年来，有学者认为细胞自噬也是细胞死亡的一种方式。

一、细胞死亡的原因

引起细胞死亡的原因很多，细胞死亡的现象也错综复杂。根据死亡原因的不同，可以将细胞死亡分为正常死亡和非正常死亡。非正常死亡主要指超过细胞可以承受的强度或阈

值的环境因子引起的死亡，以及由于机体病理状态导致的细胞死亡。这些环境因子可以是物理的，如高温与超低温、高渗与低渗、射线等；也可以是化学的，如化学毒物；还可以是生物的，如细菌和病毒的感染等。非正常死亡也称为细胞坏死（necrosis）。

二、细胞死亡的特征与形式

细胞死亡的进程可以很快，如剧烈的理化因子可使细胞迅速死亡。但在非剧烈因素作用时，细胞死亡有一定的自然过程，尤其从细胞衰老到细胞死亡是一个渐进的过程，并且常有特征性的形态改变。细胞核内有维持生命与种属延续的核酸及其核蛋白系统，因而细胞核对各种有害因子的反应也最为敏感。如果细胞核内的基因及其控制系统受到损伤，则转录、翻译等过程将中断，细胞的生命过程将改变或停止。细胞接近死亡时，核膜多发生破裂，DNA 与蛋白质降解产物泄漏至核外，核仁亦逐渐溶解和消失；胞质内可发生内质网、线粒体肿胀，线粒体嵴断裂和消失；细胞的体积因失水而变小或因细胞间水分内渗而变大；细胞表面微绒毛逐渐减少、消失。当然，由于细胞死亡原因的多样性，细胞死亡时形态改变的过程和程度不完全一样。如细胞坏死时，细胞膜和细胞浆中细胞器的质膜发生破裂，细胞浆外溢，细胞解体并引起周围组织发生炎症反应。然而，细胞凋亡时，胞膜始终保持完整，胞膜内陷将细胞内容物包被成一些囊状小体，即凋亡小体（apoptotic body），后者被周围吞噬细胞吞噬，不引起炎症反应。判断细胞是否死亡，可以用上述形态学改变作为指标，但更重要的依据是细胞是否还具有生理功能和增殖能力。

三、细胞自噬及意义

细胞自噬（autophagy）是真核生物中普遍存在的现象，通过降解细胞内的长寿命蛋白质和细胞器，产生氨基酸以维持细胞在缺乏营养时的生存。细胞自噬的一个显著特征是形成双层膜的自噬泡，自噬泡可以包裹细胞质、大型的细胞器，然后与溶酶体结合，并分解产生生物体可以利用的大分子。研究表明，细胞自噬与生物体的发育、分化相关，尤其是在低等生物中，受到环境胁迫因子的影响可以诱导细胞自噬现象的产生。自噬作用在消化的同时，也为细胞内新细胞器的构建提供原料，即细胞结构的再循环。

细胞开始自噬时，Atg8 蛋白质和一种磷脂分子结合后，黏合脂质膜，进而形成自噬体（autophagosome）。随后，自噬泡与溶酶体发生融合，自噬泡所包裹的待降解物质进入溶酶体，此时的溶酶体称为自噬溶酶体（autophagolysosome 或 autolysosome）。在自噬溶酶体中，待降解的物质在多种酶的作用下分解成氨基酸和核苷酸等，进入三羧酸循环，产生小分子和能量，再被细胞所利用。因此，长期以来细胞自噬被认为是细胞的自救行为。但近年来发现，在某些条件下，细胞自噬也能导致细胞死亡，并证明细胞自噬的发生受多种基因的调控，如 *ATG*（autophagy-related）基因、蛋白激酶基因和磷酸酶基因等。目前的研究认为，细胞自噬只发生在细胞进入周期后，静止期细胞对自噬诱导因素不敏感。

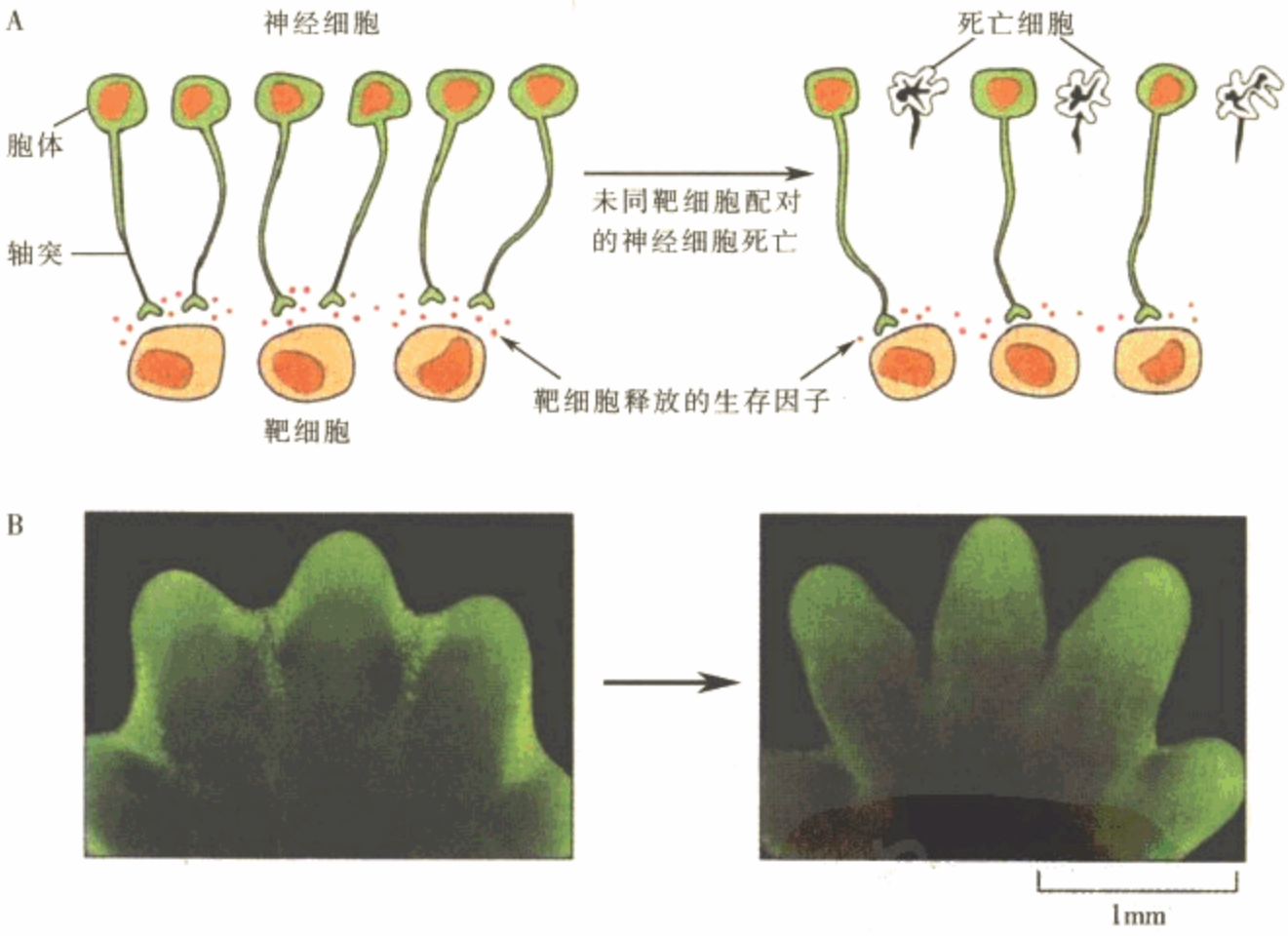
自噬作用在生物体生长发育、细胞分化及对环境应激的应答方面极为关键，对防止某些疾病如肿瘤、神经退行性疾病以及对抵御病原微生物的感染和延缓衰老、延长寿命等方面发挥重要作用。最近的研究提示自噬也参与了天然免疫应答和适应性免疫应答。

第三节　细 胞 凋 亡

细胞凋亡（apoptosis）是细胞在一定的生理或病理条件下，遵循自身的程序，自己结

束其生命的过程。“apoptosis”来源于希腊语，“apo”意为“分离”，“ptosis”指花瓣或树叶的脱落、凋零。当时选用这个词，是为了强调这种细胞死亡是自然的生理学过程。目前很多情况下，细胞凋亡亦被称作程序性细胞死亡（programmed cell death，PCD），即在一定时间内，细胞按一定的程序发生死亡，这种细胞死亡具有严格的基因时控性和选择性。但有些学者认为细胞凋亡与 PCD 有一定的区别，PCD 是一个功能性概念，描述在一个多细胞生物体中，某些细胞的死亡是个体发育中一个预定的，并受到严格控制的正常组成部分，而凋亡是一个形态学概念，指与细胞坏死不同的受到基因控制的细胞死亡形式；PCD 的最终结果是细胞凋亡，但细胞凋亡并非都是程序化的。此外，细胞凋亡也可见于 PCD 之外的病理状态，如抗癌药所致的癌细胞死亡、循环负荷过重引起的细胞死亡等。

细胞凋亡现象普遍存在于人类及多种动植物中，是多细胞生物体个体正常发育、维持成体组织结构不可缺少的部分，贯穿于生物全部的生命活动中。例如人体内每天有 5×10^{11} 个血细胞通过细胞凋亡被清除，以平衡骨髓中新生的血细胞。一旦正常的细胞凋亡过程受到破坏，将引起一系列的疾病，包括癌症、感染性疾病、自身免疫性疾病等。哺乳动物神经系统的发生过程也是细胞凋亡的典型例子。在脊椎动物发育早期，一般先要产生过量的神经元，但后来近一半的神经元发生凋亡，只有那些与靶细胞（target cell，如肌细胞、腺体细胞等）建立起良好的突触联系，并充分接受了靶细胞分泌的存活因子的神经元才保留了下来（图 15-2）。肿瘤的侵袭转移涉及肿瘤细胞黏附、基质降解、肿瘤细胞的迁移等，



●图 15-2　细胞凋亡的事例

A. 发育中神经细胞的凋亡　B. 哺乳动物手指和脚趾在发育早期是连在一起的，指（趾）间的蹼通过细胞凋亡被清除，使单个指（趾）分开　C. 幼体的蝌蚪向成体发育过程中尾部细胞的凋亡

而失巢凋亡在肿瘤细胞的扩散和转移中起重要作用。

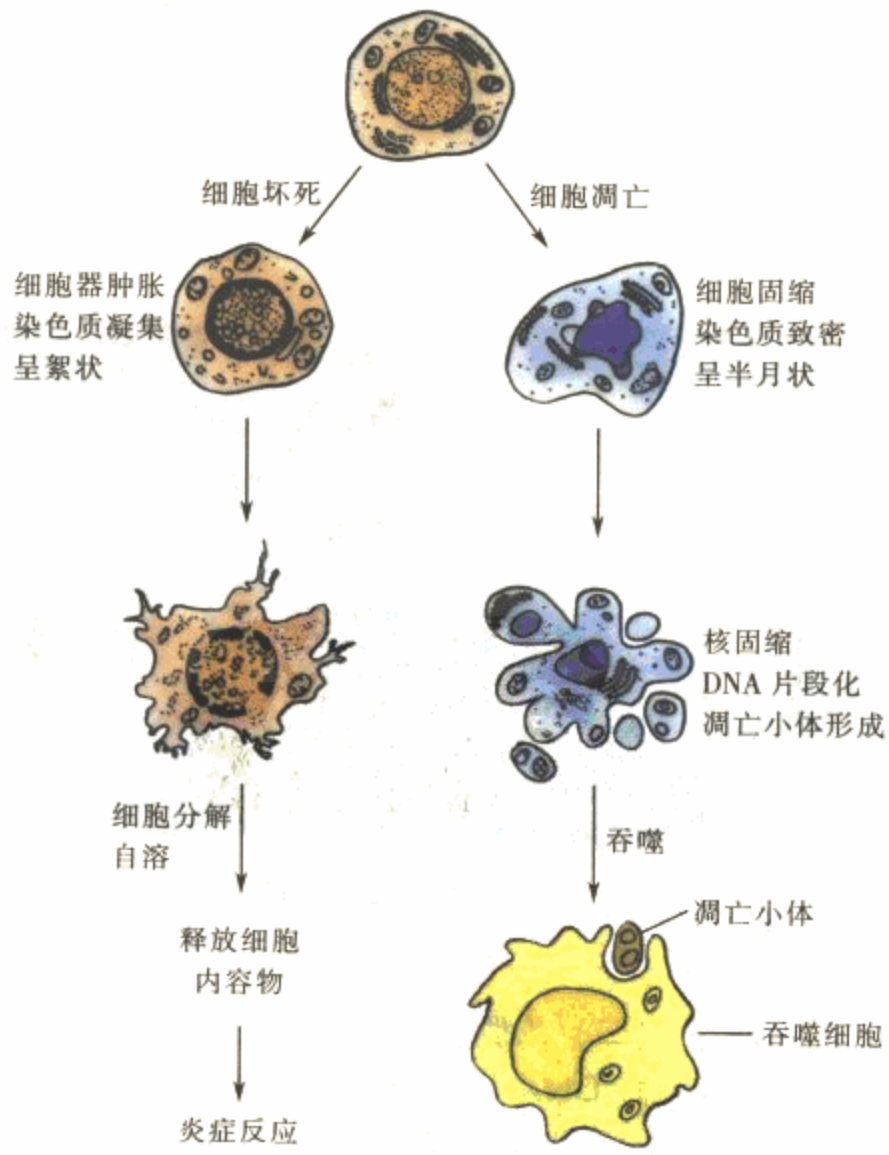
一、细胞凋亡的概念与特征

由于细胞凋亡是一种主动的、由基因决定的细胞自杀（cell suicide）过程，其性质与细胞坏死完全不同，两者属于截然不同的细胞学现象（表 15-2）。细胞坏死是指细胞受到

表 15-2　细胞凋亡和细胞坏死的比较

比较内容	细 胞 凋 亡	细 胞 坏 死
起因	生理或病理性	病理性变化或剧烈损伤
范围	单个散在细胞	大片组织或成群细胞
细胞膜	保持完整，一直到形成凋亡小体	破损
细胞核	固缩，DNA 片段化	弥漫性降解
染色质	凝聚在核膜下呈半月状	呈絮状
线粒体	自身吞噬	肿胀
细胞体积	固缩变小	肿胀变大
凋亡小体	有，被邻近细胞或巨噬细胞吞噬	无，细胞自溶，残余碎片被巨噬细胞吞噬
基因组 DNA	有控降解，电泳图谱呈梯状	随机降解，电泳图谱呈涂抹状
基因活动	有基因调控	无基因调控
自吞噬	常见	缺少
蛋白质合成	有	无

激烈的物理、化学刺激或严重的病理性刺激后，引起的细胞损伤和死亡。细胞坏死时，细胞膜发生渗漏，细胞内容物（包括膨大、破碎的细胞器以及染色质片段等）释放到胞外，导致炎症反应；而在细胞凋亡过程中，细胞膜反折并包裹断裂的染色质片段或细胞器等，随后逐渐分离而形成众多的凋亡小体，并最终为邻近的吞噬细胞所吞噬破坏。行使吞噬功能的细胞一般是巨噬细胞，有时是上皮细胞或血管内皮细胞。整个凋亡过程中，细胞膜的完整性保持良好，死亡细胞的内容物不会逸散到胞外环境中，因此并不引发炎症反应（图15-3）。

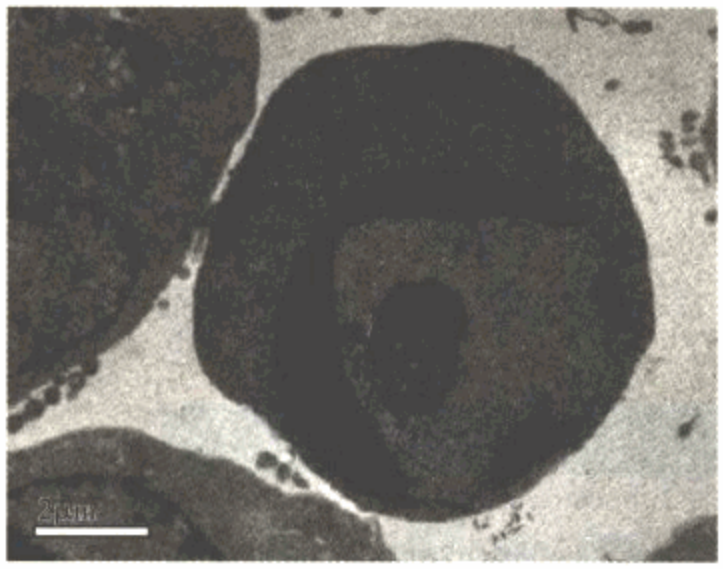


●图 15-3　细胞凋亡与细胞坏死的形态比较

（一）细胞凋亡呈现出特征性形态学变化

主要包括细胞皱缩（cell shrinkage）、染色质凝聚（chromatin condensation）、凋亡小体形成、细胞骨架解体等，其中以胞核的变化最为显著。

1. 细胞核的变化　凋亡细胞的核 DNA 在核小体连接处断裂成核小体片段，并向核膜下或中央部异染色质区聚集，浓缩成染色质块，使细胞核呈现新月状、花瓣状等多种形态



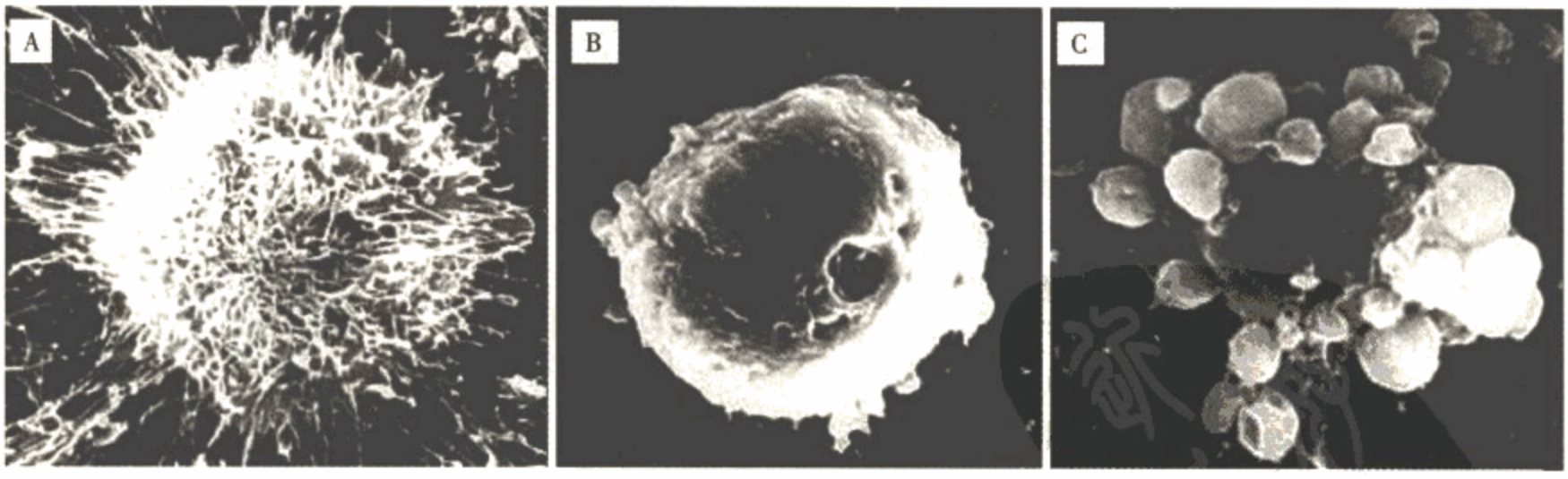
●图 15-4　凋亡细胞核的“新月状”结构
（浙江大学李继承教授提供）

（图 15-4），染色质进一步聚集使核膜在核膜孔处断裂，形成核碎片或核残片。

2. 细胞质的变化　由于脱水作用，凋亡细胞的胞质发生明显浓缩，其中的细胞器也发生不同程度的变化，尤其是线粒体和内质网。凋亡早期，可观察到细胞内线粒体增大，嵴增多，接着线粒体出现空泡化。多数情况下，凋亡细胞内的内质网腔扩张膨大，并为凋亡细胞形成的自噬体结构提供包裹膜。细胞原有的疏松、有序的细胞骨架结构也变得致密和紊乱。实际上，细胞骨架的改变不仅仅是细胞凋亡的后果，还影响到细胞凋亡的过程。

3. 细胞膜的变化　细胞表面原有的特化结构，如微绒毛、细胞突起及细胞间连接等逐渐消失，细胞膜起泡，但细胞膜仍保持完整，没有失去选择通透性。一些与细胞间连接有关的蛋白质从凋亡细胞的膜上消失，但正常情况下位于细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine，PS)则从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的表面，暴露于细胞外环境中。这些分子可能与凋亡细胞的清除过程有关。

4. 凋亡小体的形成　凋亡小体的形成有三种方式：①发芽脱落机制：凋亡细胞内聚集的染色质块，形成大小不等的核碎片后，整个细胞通过发芽（budding）、起泡（zeiosis）等方式，形成一个球形的突起，并在根部绞窄脱落，形成一些大小不等，内含胞质、细胞器以及核碎片的膜包小体，即凋亡小体（图 15-5）。②分隔机制：在凋亡细胞内由内质网分隔成大小不等的分隔区，靠近细胞膜端的分隔膜与细胞膜融合并脱落形成凋亡小体。③自噬体形成机制：凋亡细胞内线粒体、内质网等细胞器和其他胞质成分一起被内质网膜包裹形成自噬体，自噬体在与凋亡细胞膜融合后排出胞外，形成凋亡小体。有些细胞不形成凋亡小体，而仅仅发生核固缩和胞质浓缩，成为单个致密的结构，这也被称为凋亡小体。在病毒性肝炎中见到的嗜酸性小体（councilman's body）就是凋亡小体的例子。

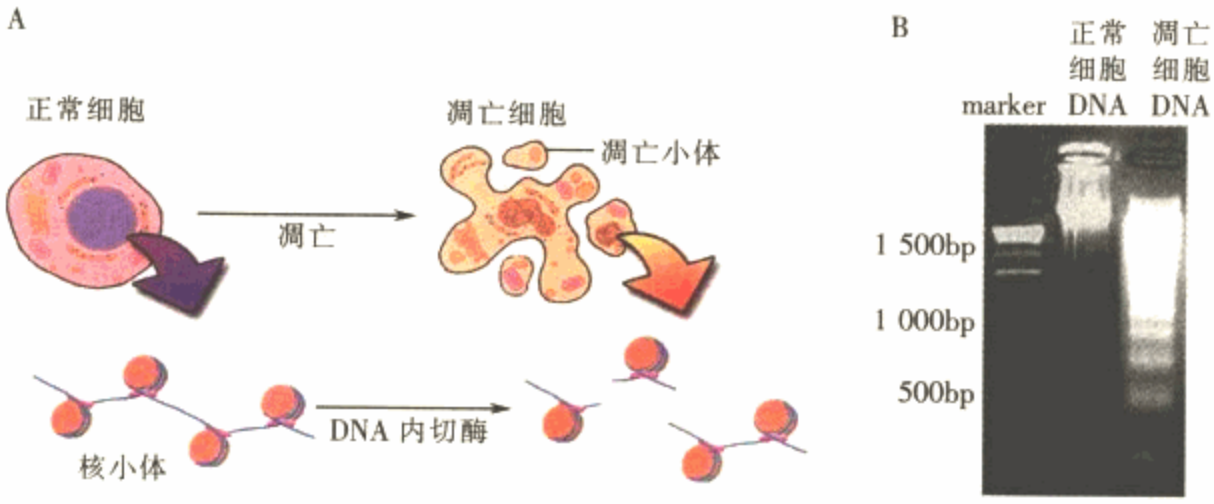


●图 15-5　扫描电镜下的凋亡细胞表面变化（山东大学辛华教授提供）
A. 正常细胞　B. 微绒毛消失　C. 凋亡小体

（二）细胞凋亡时细胞生化改变的复杂性和多样性

1. DNA 片段化　核小体（nucleosome）是基因组染色体的基本结构，它和连接区（linker）组成核心核小体亚单位（core nucleosomal subunit），总长度为 180~200bp。细胞凋亡时，细胞的内源性核酸内切酶（endonuclease）活化，特异地在连接区切断 DNA 链。

因此，形成长度为 180~200bp 整数倍的寡聚核苷酸片段，这种 DNA 片段化(fragmentation)的结果是在进行琼脂糖凝胶电泳时，凋亡细胞表现出特征性的 DNA 梯状条带（DNA ladder）（图 15-6）。而细胞坏死时，DNA 随意断裂为长度不一的片段，琼脂糖凝胶电泳呈“弥散状”(smear)。因此，尽管不是所有凋亡细胞都出现 DNA 梯状条带，人们仍把它作为细胞凋亡最典型的生化特征之一。



●图 15-6　凋亡细胞 DNA 凝胶电泳时呈现梯状条带

A. 细胞凋亡中 DNA 内切酶的活化　B. 细胞凋亡所形成的 180~200bp 整倍性 DNA 片段

2. 细胞凋亡中的蛋白酶　细胞凋亡的始动，以及发生、发展，主要是通过多种蛋白酶控制的，蛋白酶级联切割可能是凋亡最关键的过程，因此有学者提出蛋白酶的作用是凋亡机制的核心部分。控制凋亡的蛋白酶有多种，如胱天蛋白酶（cystein aspartic acid specific protease，caspase）家族、钙蛋白酶（calpain）等。

3. 胞浆 Ca^{2+}、pH 的变化　有研究认为 Ca^{2+}能通过两条途径诱导细胞凋亡。一是胞内 Ca^{2+}库释放，胞外 Ca^{2+}内流使胞浆内 Ca^{2+}持续升高，作为凋亡信号启动凋亡；二是Ca^{2+}的释放打破了细胞内结构的稳定，使细胞凋亡系统的关键成分与正常时不能接触到的基质发生反应，从而触发凋亡。胞内的氢离子和钙离子一样，其浓度对生命活动影响重大。用地塞米松诱导巨噬细胞凋亡时，可观察到胞浆内的 pH 先是急速升高，之后又缓慢降低，这表明胞浆碱化和酸化均能影响细胞凋亡，前者可能与细胞凋亡的启动有关，而后者可能是细胞凋亡的必然结果。

4. 线粒体在细胞凋亡中的作用　细胞发生凋亡时，细胞质中的细胞器也是凋亡的主要目标，尤其是凋亡时，线粒体发生一系列显著的变化：①线粒体呼吸链受损，能量代谢受到破坏，导致细胞死亡。②线粒体释放细胞色素 C（cytochrome C，cyt C），而 cyt C 是凋亡所必需的胱天蛋白酶家族的激活物。③线粒体是细胞产生活性氧类物质（reactive oxygen species，ROS）的主要来源，ROS 是细胞凋亡的信使分子和效应分子，凋亡时线粒体生成 ROS 增多。④线粒体渗透转变孔（permeability transition pore，PT pore）通透性增高，这是凋亡早期的决定性变化。PT 孔是线粒体内膜和外膜在接触部位协同组成的一条通道，PT 孔的开放可导致线粒体呼吸链解耦联，并且线粒体内的 cyt C 可通过开放的 PT 孔释放至胞质，进而触发 caspase 级联反应。PT 孔开放抑制剂，如环孢素(cyclosporin)，能够阻断细胞凋亡，表明 PT 孔在凋亡过程中具有重要作用。此外，有学者曾提出线粒体调控细胞凋亡的观点，可见线粒体在细胞凋亡过程中起很重要的作用。

表 15-2 总结了凋亡与坏死的区别。

（三）失巢凋亡是又一种形式的细胞程序性死亡

失巢凋亡（anoikis）是又一种形式的细胞程序性死亡，是因细胞与细胞外基质和其他细胞脱离接触而诱发的。正常的上皮或内皮细胞具有黏附依赖性，其存活依赖于细胞间和

细胞与基质间的信号传递，称为锚定依赖。正常上皮细胞或不具备转移性质的实体瘤细胞从原位脱落进入血流后就会引发细胞凋亡，这种在脱离原来生存环境的特殊情况下发生的细胞凋亡称为失巢凋亡。这种现象在某些细胞分化生长周期短、组织更新快的细胞中表现更为明显。例如，小肠上皮是人体内更新最快的组织之一，小肠上皮细胞从基底膜移动到上皮表面只需要 6~7 天的时间。小肠上皮细胞的生长和分化对基底膜的依赖性更为明显。因此，一旦发生脱落，细胞就很容易发生凋亡。在体外培养的情况下，小肠上皮细胞也很容易出现凋亡现象，因此经常以小肠上皮细胞作为研究凋亡现象的对象。除上皮细胞和内皮细胞外，其他类型的细胞也出现失巢凋亡现象，如骨骼肌细胞、某些致瘤潜力低的黑色素瘤细胞以及胚胎成纤维细胞等。失巢凋亡的意义在于防止这些脱落的细胞种植并生长于其他不适宜的地方。而肿瘤细胞，尤其是一些容易发生远处转移的恶性肿瘤细胞，具有极强的抗失巢凋亡特性，从瘤体上脱落进入循环系统后并不发生凋亡，从而完成转移过程。恶性肿瘤的这种抗失巢凋亡特性已经在肺癌、肠癌、卵巢癌、恶性黑色素瘤、口腔鳞状细胞癌等的癌细胞体外培养实验中得到证实。

二、细胞凋亡的影响因素

随着细胞凋亡在医学、生物学方面研究的深入，人们发现能诱导细胞凋亡的因素越来越多。同一组织和细胞受到不同凋亡诱因的作用，其反应结果不尽相同，而同一因素对不同组织和细胞诱导凋亡的结果也各不相同。目前，多数研究者认为，细胞凋亡的发生受以下两种因素调节。

（一）细胞凋亡的诱发因素

1. 生理性诱导因子 肿瘤坏死因子（TNF）及其家族中 Fas 配体（FasL）、转化生长因子 β（TGF-β）、神经递质（谷氨酸，多巴胺，N-甲酰-D-天门冬氨酸）、Ca^{2+}、糖皮质激素等。

2. 损伤相关因子 热休克、病毒感染、细菌毒素、原癌基因（如 *myc*，*rel*，腺病毒 *E1A* 等）、抑癌基因（如野生型 *p53* 基因）、细胞毒性 T 淋巴细胞、氧化剂、自由基、缺血、缺氧等。

3. 疾病治疗相关因子 化疗、放疗、生物治疗、中药治疗等。

4. 其他有某些细胞毒性物质 如乙醇、氧化砷、β-淀粉样肽等。

（二）细胞凋亡的抑制因素

1. 生理性抑制因子 如 *bcl-2* 原癌基因、突变型 *p53*、各种生长因子、细胞外基质、CD40 配体、一些中性氨基酸、锌以及雌、雄激素。

2. 病毒基因 如腺病毒 E1B、杆状病毒（baculovirus）、牛痘病毒 crmA、EB 病毒 BHRF1 及 LMP-1、单纯疱疹病毒等基因。

3. 其他 线虫的 *ced-9* 基因、半胱氨酸蛋白酶抑制剂、钙蛋白酶抑制因子、促癌剂（如 PMA 等）。

三、细胞凋亡的分子机制

大量的研究资料表明，细胞凋亡与某些基因的调控作用密切相关，因此人们将这些基因称为凋亡相关基因，并开始用它们来解释凋亡的分子机制。

（一）细胞凋亡受多种基因调控

1. 调控细胞凋亡的 *ced* 基因家族 有关细胞凋亡的基因调控资料，最早和最完整的

都来自对线虫体细胞凋亡的研究。由于线虫成虫的体细胞仅有 1 090 个，在发育过程中共有131 个体细胞发生凋亡，研究者们可以从其受精卵起追踪每一个胚胎细胞的发育和分化过程。研究已发现有 15 个基因在不同程度上与线虫的细胞凋亡有关，并可大致分为 4 组：第一组基因在线虫的凋亡调控中有重要意义，包含 *ced-3*、*ced-4* 和 *ced-9* 基因；第二组包含 7 个基因，即 *ced-1*、*ced-2*、*ced-5*~*ced-8* 以及 *ced-10*，它们与凋亡细胞被吞噬清除过程有关，但与细胞死亡本身无关；第 3 组包含核酸酶基因 1（*nmc-1*），如果 *nmc-1* 发生突变，则 DNA 裂解受阻，但并不能抑制细胞死亡，这也表明 *nmc-1* 并非凋亡所必需；第 4 组是影响特异细胞类型凋亡的基因，包括 *ces-1*、*ces-2*（*ces* 表示线虫细胞存活的调控基因）以及 *egl-1* 和 *her-1*，它们与某些神经元和生殖系统体细胞的凋亡有关。

（1）*ced-3* 和 *ced-4* 基因：在线虫所有凋亡细胞中，均有 *ced-3* 和 *ced-4* 的表达，这两个基因的激活是线虫细胞凋亡起始或继续所必需的。一旦基因突变使 *ced-3* 或 *ced-4* 灭活，将阻碍正常凋亡的发生，使发育过程中本该死亡的细胞也存活下来。*ced-3* 和 *ced-4* 基因主要表达在线虫胚胎发生期，此期正是凋亡多发期。人们已发现哺乳类细胞中存在 *ced-3* 的同源物胱天蛋白酶家族，后者是一组半胱氨酸天冬氨酸酶，它们的共同特点是能特异性地断开天门冬氨酸残基后的肽键。胱天蛋白酶家族有十余个成员，是凋亡过程最重要的影响因素之一，但不同成员在凋亡中起的作用不全相同，如 Caspase-1，Caspase-11 主要参与白细胞介素前体的活化，并不直接参加凋亡的信号转导；而 Caspase-2、Caspase-8、Caspase-9 和 Caspase-10 参与凋亡的起始；参与凋亡执行的是 Caspase-3、Caspase-6 和 Caspase-7，它们能降解多种底物，导致核纤层和细胞骨架的断裂崩解等。目前认为，凋亡的起始者（如 Caspase-8）与执行者（如 Caspase-3）之间存在上下游的关系，即起始者活化执行者。*Ced-4* 的哺乳类同源物直到 1997 年才被证明是细胞凋亡蛋白酶活化因子-1（apoptosis protease activating factor-1，Apaf-1）。

（2）*ced-9* 基因：*ced-9* 基因的作用与 *ced-4* 基因相反。*ced-9* 能抑制胱天蛋白酶的活化，从而抑制线虫体细胞凋亡的发生，因此 *ced-9* 也被称为“抗凋亡基因”（anti-apoptosis gene）。*ced-9* 的显性突变可阻止那些注定要死亡的细胞不发生凋亡，而其突变失活则导致正常情况下应存活的细胞发生凋亡。*ced-9* 与哺乳动物的 *bcl-2* 家族具有一定的同源性。*bcl-2* 家族的一些成员（包括 *bcl-2* 本身）与 *ced-9* 具有相似的功能，但另一些成员则能促进凋亡。

经典实验：细胞程序性死亡相关基因的鉴定

背景知识

自 20 世纪 60 年代起人们认识到细胞死亡是动物发育过程中的正常事件，可能是某些注定死亡的细胞受到精细调控的结果。线虫作为生物发育研究中的重要的模式生物，在细胞程序性死亡的调节和机制研究方面起着至关重要的作用。70 年代，通过显微分析的方法构建了线虫发育的图谱，这一研究成果使人们得以了解线虫胚胎起源和每个细胞的定向分化情况，尤其是引入了一种特殊的细胞程序性死亡模式。1977 年，John Sulston 和 H. Robert Horvitz 发现在线虫成虫发育早期的 1 090 个细胞中，有 131 个发生程序性死亡。同一类型的细胞在所有的胚胎中同时死亡，说明这种类型的细胞在胚胎发育中死亡是正常的发育现象。并且这种类型的细胞在死亡过程中呈现出相似的形态学变化，提示这种细胞的程序性死亡过程受相同的机制调控。

为进一步探讨线虫发育过程中细胞程序性死亡的机制和调节方式，Horvitz 等进行了一系列遗传学分析。在 1986 年发表在 Cell 的文章上，Hilary Ellis 和 Horvitz 首次报道

了2个线虫发育过程中的细胞程序性死亡相关基因。自此，拉开了凋亡分子生物学研究的序幕。

实验内容

线虫中发生程序性死亡的细胞在镜检时呈现较高的折光率，因此Ellis和Horvitz可以运用这种分析方法识别未发生死亡的突变体。为了分离死亡过程中出现异常的突变体，他们用能与DNA结合的化学诱变剂甲磺酸乙酯（ethyl methanesulfonate，EMS）处理大约4 000条线虫，最终发现了2个未发生预期死亡的突变体。这2个突变体都在*ced-3*基因上发生了隐性突变。进一步研究发现*ced-3*基因突变阻碍了131个发育过程中的正常的程序性细胞死亡过程。

在后续的研究中他们鉴定了另一个与*ced-3*基因类似的抑制细胞程序性死亡的突变基因。这个基因叫*ced-4*，定位于另一条染色体上。*ced-4*隐性突变也可以阻碍线虫中所有的程序性细胞死亡进程。

发表论文

Hilary M. Ellis and H. Robert Horvitz（Massachusetts Institute of Technology，USA）：Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. Cell，1986，44：817-829

后续影响

Ellis和Horvitz通过分离线虫突变体首次鉴定了细胞程序性死亡相关基因。*ced-3*、*ced-4*以及后来鉴定的*ced-9*基因编码的蛋白在生物进化中高度保守，是凋亡发生中的起主要作用的调节因子和效应因子的蛋白前体。*ced-3*的克隆和测序结果显示它与之前在哺乳动物中鉴定的caspase蛋白酶原同源。线虫*ced-9*基因与人B淋巴细胞中分离的凋亡抑制因子*bcl-2*原癌基因同源。*Ced-4*与人类凋亡蛋白酶原激活因子1（Apaf-1）同源。线虫中这些细胞程序性死亡相关基因的鉴定为深入理解凋亡的分子基础和正常组织发育的机制奠定了基础。由于凋亡的异常调节与包括癌症、自主免疫系统疾病、神经退行性疾病在内的许多疾病相关，Ellis和Horvitz的科学发现在生物学和医学领域产生了深远的影响。由于其贡献，Horvitz和英国的Sydney Brenner以及John E. Sulston共同获得了2002年诺贝尔生理学或医学奖。

2. 既能抑制又能促进细胞凋亡的*bcl-2*基因家族　*bcl-2*基因是B细胞淋巴瘤/白血病-2（B-cell lymphoma/leukemia-2，bcl-2）的缩写。*bcl-2*不仅存在于B细胞淋巴瘤中，也见于许多正常组织和胚胎组织中，如神经组织，非分泌腺的导管细胞，成人和胚胎的皮肤，以及胚胎的肾脏与软骨组织。随着研究的深入，Bcl-2蛋白家族不断扩大，其中有的成员对凋亡起抑制作用，如Bcl-2可防止或延迟由γ-辐射、糖皮质激素、热休克和多种化疗药物所诱导的细胞凋亡，故*bcl-2*基因也被称作“存活基因”（survival gene）；但有的是凋亡的促进者，如Bad、Bax等。Bcl-2家族的蛋白氨基酸序列除了在BH1、BH2和BH3三个区段有高度保守性外，在氨基端还有一个比较保守的区段S1，这可能是调节凋亡以及蛋白质相互作用所必需的结构。

3. 可促进细胞凋亡的*ice*基因　白细胞介素-1β转换酶（interleukin-1β converting enzyme，ICE）基因与线虫的*ced-3*基因在DNA序列上高度同源。ICE蛋白是一种半胱氨酸蛋白酶，其作用是将前白细胞介素-1β分解成有生理活性的白细胞介素-1β。ICE过度表达可诱导哺乳动物纤维母细胞发生凋亡，而ICE的抑制剂，如牛痘病毒*crmA*基因可通过抑制ICE阻断凋亡的发生。

4. 参与调节细胞凋亡的*p53*基因　1979年，D. I. Linzer等在研究病毒转染的哺乳动

物细胞时发现了分子量为 53kD 的 p53 蛋白。后来，用克隆的鼠 *p53* 基因和激活的 *ras* 基因共同转染细胞，成功地诱发了肿瘤。到 1989 年，发现此前转染所用的是突变型 *p53* 基因，而野生型 *p53* 对细胞的生长有负调节作用，从而认定 *p53* 是抑癌基因。*p53* 基因是肿瘤中突变频率最高的抑癌基因，近年的研究表明它能引起细胞周期阻滞，诱导凋亡和促进细胞终末分化，因此与细胞凋亡存在密切关系。人类 p53 蛋白存在两种形式——野生型（wt p53）和突变型（mt p53），二者均参与调节细胞凋亡，但前者对细胞增殖、转化有抑制作用，故能促进凋亡，而后者可灭活前者的功能，抑制凋亡并导致细胞转化和过度增殖而产生肿瘤行为。

现已明确化疗药物、放射线及多种细胞因子等诱导的肿瘤凋亡过程中需要 *p53* 基因的参加，而糖皮质激素、钙离子载体和衰老等引起的凋亡却无需 p53 蛋白的存在，其中的确切机制尚不清楚。目前认为，*p53* 基因产物 p53 蛋白是转录激活蛋白，作为“基因警卫”维持细胞基因的完整性、DNA 损伤的修复以及细胞周期的正常运转。当 *p53* 基因缺失或异常时，*p53* 失去监视作用，使细胞带着损伤的 DNA 进入 S 期，结果细胞因遗传不稳定性而产生突变和畸变，最后导致细胞癌变。可见，*p53* 基因产物诱导细胞凋亡可提供一种防护机制，使 DNA 损伤的细胞不能存活。

5. 可触发细胞凋亡的 Fas 和 FasL　Fas 是属于肿瘤坏死因子受体（tumor necrosis factor receptor，TNFR）和神经生长因子受体（nerve growth factor receptor，NGFR）超家族的细胞表面分子，Fas 配体（Fas ligand，FasL）是 TNF 家族的细胞表面分子。多种哺乳细胞表达 Fas，而 FasL 仅表达于活化的 T 细胞。FasL 与其受体 Fas 结合将导致携带 Fas 的细胞凋亡。人的 *Fas* 基因位于第 10 号染色体的长臂上，FasL 的基因定位于第 1 号染色体，在结构上与 *TNF-α* 基因相似。

Fas/FasL 的重要生理作用表现在：①Fas/FasL 触发细胞凋亡。抗 Fas 抗体、表达 FasL 的细胞，以及可溶性的 FasL 与 Fas 交联后均产生细胞凋亡信息；②Fas/FasL 对免疫系统细胞的死亡起重要作用。以 Fas 为基础的和以穿孔素为基础的机制，是迄今发现的两种 T 细胞介导的细胞毒机制；③Fas/FasL 介导免疫“豁免”。正常情况下，眼睛是免疫豁免区，因病毒感染而进入前房的炎症细胞将通过 Fas/FasL 系统出现凋亡，然而缺乏有功能的 FasL 的突变小鼠在受到感染时，眼内出现了明显的炎症反应。

Fas 系统参与清除活化的淋巴细胞和病毒感染的细胞，而 Fas 和 FasL 功能丧失的突变可致淋巴细胞积聚，进而导致自身免疫疾病；另一方面，一次注射抗 Fas 抗体足以使成年小鼠在几个小时内死亡，这些研究结果表明 Fas 系统具有重要的病理学意义。

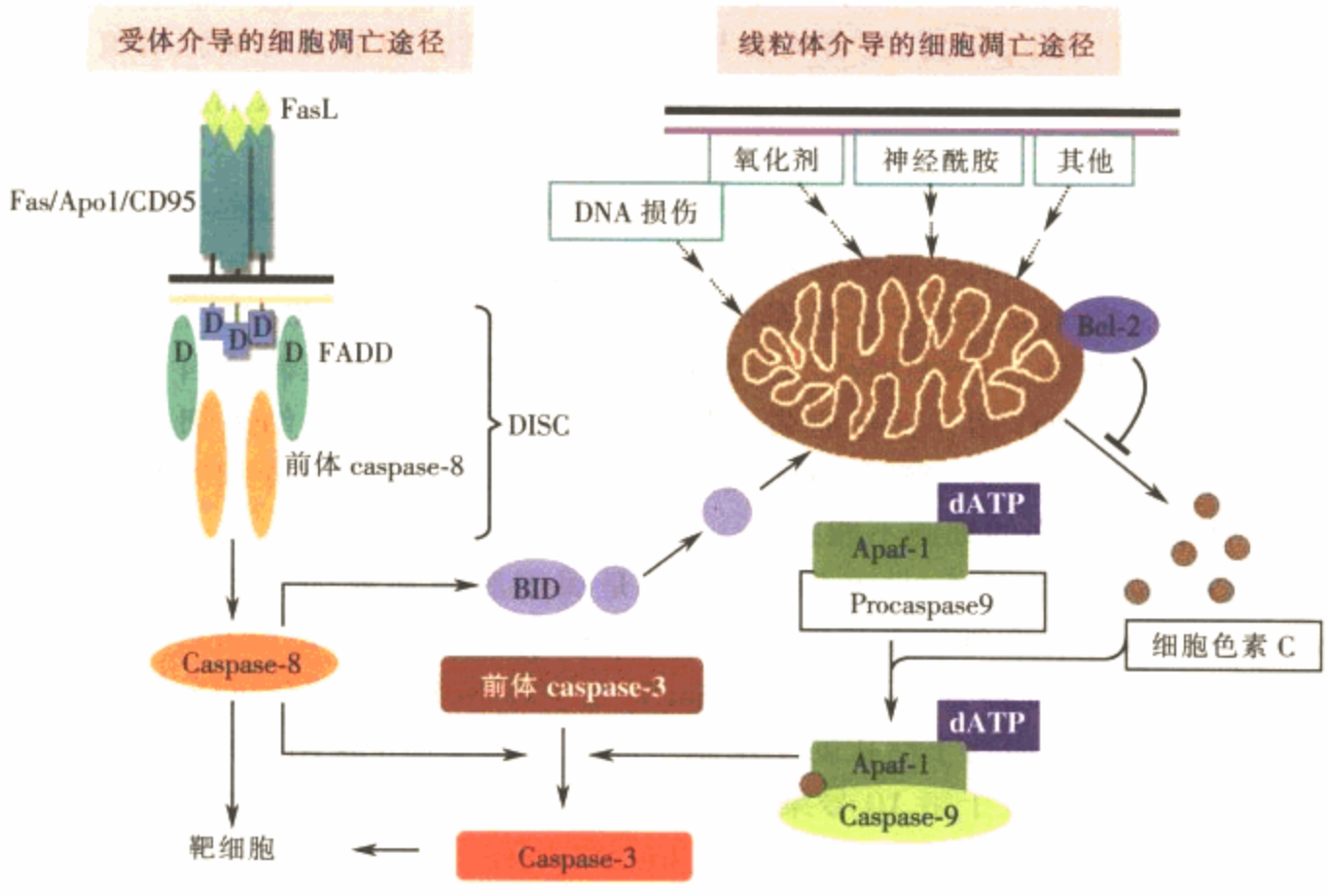
6. *c-myc* 基因既是凋亡的激活因子又是抑制因素　*c-myc* 基因可以产生两种翻译产物 c-Myc1 和 c-Myc2，两者的作用不同，有时甚至是相反的。c-Myc 主要参与转录，在转录过程中可以激活并诱导细胞周期进程和分化，也可以阻止细胞分化或引起凋亡，因此它既是凋亡的激活子又是凋亡的抑制因素。c-Myc1 和 c-Myc2 的作用不能一概而论，并受作用细胞的微环境、时期、位点以及自身的质和量的影响。

除了上述基因或蛋白产物，其他一些基因如 *jun* 基因、*c-fos* 基因及 *myb* 基因等都已证明与凋亡有关。然而，由于凋亡的研究起步较晚，凋亡的过程又异常复杂，至今有很多问题尚无法阐明，因此我们只能将这些基因称为凋亡相关基因，而不能简单地称之为凋亡基因，它们所引起的凋亡是在一定条件下、对特定的细胞而言的。

（二）细胞凋亡的信号转导通路主要由死亡受体和线粒体介导

细胞凋亡与细胞生长、分化一样，其过程一方面受细胞内和胞外多种信号的调控，另一方面也通过多种生物信号在细胞间和细胞内的传递而得以实现。目前的研究表明，细胞凋亡的信号传导途径具有以下特点：①传导途径的启动可因细胞的种类、来源、生长环境

及诱因的不同而存在差异；②凋亡信号传导系统具有多样性；③细胞凋亡的信号途径与细胞增殖、分化的途径存在一些共同通路；④凋亡的多条信号途径间存在互通的交叉部分。现有研究表明，死亡受体和线粒体介导的细胞信号转导通路在细胞凋亡中起重要作用（图15-7）。



● 图 15-7　哺乳动物细胞凋亡的主要信号转导通路

1. 死亡受体介导的信号转导通路　细胞外的许多信号分子可以与细胞表面相应的死亡受体（death receptor，DR）结合，激活细胞凋亡信号通路，导致细胞凋亡。哺乳动物的死亡受体属于肿瘤坏死因子受体和神经生长因子受体超家族，主要成员有 Fas/Apo-1/CD95，DR-4/TRAIL-R1，DR3/WSL-1/Apo-3/TRAMP 等。配体 FasL 与死亡受体 Fas 结合后，诱导 Fas 胞质区内的死亡结构域（death domain，DD）结合 Fas 结合蛋白（FADD），FADD 再以其氨基端的死亡效应结构域结合 caspase-8 前体，形成 Fas-FADD-caspase-8 前体组成的死亡诱导复合物（death inducing signaling complex，DISC），激活 caspase-8，活化的 caspase-8 可以进一步激活执行死亡功能的效应蛋白 caspase-3、6、7 等，导致细胞凋亡。

2. 线粒体介导的信号转导通路　研究表明，线粒体在细胞凋亡中处于凋亡调控的重要位置，许多凋亡信号（如 DNA 损伤、氧化剂等）都可以引起线粒体的损伤和膜渗透性改变。很多 Bcl-2 家族的蛋白如 BCL-2、BAX、BCL-XL 等都定位于线粒体膜上，BCL-2 通过阻止 cyt C 从线粒体释放来抑制凋亡；而 BAX 则通过与线粒体上的膜通道结合，促使 cyt C 的释放而促进凋亡。进入胞浆的 cyt C 可以与 Apaf-1 一起与 caspase-9 的前体结合，从而导致 caspase-9 的活化，后者可以激活 caspase-3，引起细胞凋亡。

此外，活化的 caspase-8，一方面作用于 caspase-3 前体，另一方面催化 BID（Bcl-2 家族的促凋亡分子）裂解成两个片段，其中含有 BH3 结构域的 C-端片段被运送到线粒体，引起线粒体内 Cyt C 高效释放。BID 诱导 Cyt C 释放的效率远高于 BAX。

3. 其他转导通路　最近的研究表明，线粒体内可能存在核酸内切酶 G（endonuclease G）、凋亡诱导因子（AIF）和凋亡抑制因子（IAP）的抑制蛋白 Smac/Diablo，这些蛋白因子可能参与了不依赖 caspases 的凋亡途径。

四、细胞凋亡的检测

检测细胞凋亡的方法有很多，归纳起来，可分为三方面：形态学检测、生化检测和流式细胞仪检测。

（一）形态学检测

形态学检测是鉴定细胞凋亡最可靠的方法之一。主要是通过光学显微镜和电子显微镜，对组织或细胞进行各种染色，如 HE 染色、甲基绿-派诺宁染色、Giemsa 染色，可在普通光学显微镜下观察；用荧光染料，如吖啶橙，Hoechst 33258 染色，在荧光显微镜下观察；或制成超薄切片用电子显微镜观察，都可以区分细胞凋亡与坏死。

（二）生化特征检测

细胞凋亡最显著的生化特征是 Ca^{2+}、Mg^{2+}依赖的内源性核酸酶激活后，将细胞核染色体从核小体间断裂，形成约为 180~200bp 或其多聚体组成的寡核苷酸片段。针对此寡核苷酸片段发展了检测凋亡的琼脂糖凝胶电泳法、原位末端标记法和 ELISA 法等，这些方法具有很高的特异性和敏感性，为凋亡的研究提供了强有力的工具和手段。

（三）流式细胞仪检测

用流式细胞仪检测细胞凋亡有其他方法不可比拟的优越性，既可定性又可以定量，且具有简单、快速和敏感性高等优点，通过流式细胞仪，还可以将细胞分类后作进一步形态学和生化分析。流式细胞仪检测凋亡的原理，主要是根据凋亡引发的在细胞、亚细胞和分子水平所发生的特征性改变（包括细胞膜、细胞器和细胞核等的改变），造成染色体荧光染料（fluorochromes）对凋亡细胞 DNA 可染性（DNA stainability）发生改变，以及细胞形态的改变影响了光散射特性。用流式细胞仪可以检测出凋亡的亚二倍体细胞，即凋亡细胞在 DNA 直方图上正常二倍体细胞的 G_0/G_1 峰前出现一个亚二倍体峰（apoptotic peak，AP 峰）。

近来，已有研究人员开发出用于检测细胞凋亡的试剂盒，如双重凋亡检测试剂盒，它利用凋亡细胞中 NO 合成水平的变化，以及胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸在凋亡时翻转到膜外的特点，结合荧光染色，实现在同一个细胞中检测上述两个凋亡事件，灵敏度和特异性都很高。

五、细胞凋亡与疾病

细胞凋亡是机体维持自身稳定的一种生理机制。机体通过细胞凋亡清除损伤、衰老与突变的细胞，维持生理平衡。某些致病因子可使细胞凋亡的基因调控失常，致使细胞凋亡减弱或增强，从而破坏了机体细胞的自稳态，最终导致各种疾病的发生。

（一）细胞凋亡过低导致相关的疾病发生

1. 细胞凋亡与肿瘤　细胞凋亡在肿瘤的发病机制中占有重要地位。癌变前的细胞可以通过细胞凋亡的正常调节而被清除。恶性肿瘤发病过程中，常可见到凋亡抑制基因和凋亡活化基因表达异常。如在人的肿瘤细胞中常常检测到 *p53* 基因的突变或缺失，使细胞对 DNA 损伤敏感性大大降低，细胞凋亡发生障碍进入无序、失控的生长状态。一般肿瘤细胞高表达 FasL，借以凋亡淋巴细胞，而又低表达 Fas，而降低凋亡，这就形成肿瘤细胞有逃逸免疫及凋亡耐受的特性。

2. 细胞凋亡与系统性红斑狼疮　系统性红斑狼疮（systemic lupus erythematosus，SLE）是典型的自身免疫性疾病。由于 Fas 表达缺陷，引起自身反应性 T 细胞的凋亡功能丧失，导致 T 淋巴细胞凋亡障碍，因此在外周淋巴器官出现大量 $CD4^+$、$CD8^+$的 T 淋巴细胞，这

些细胞具有自身反应性，从而引起 SLE 自身免疫性疾病。

（二）细胞凋亡过度导致相关的疾病发生

1. 细胞凋亡与神经退行性疾病　中枢神经系统不同部位特殊类型神经元的丧失是各种神经退行性疾病的病理特点，细胞凋亡与神经元的丢失密切相关。现已发现，caspase-3 在神经退行性疾病的病理过程中担任重要的角色，它不仅是起着凋亡的效应器作用，还能直接与阿尔茨海默病（AD）、帕金森病（PD）、亨廷顿舞蹈病、脊椎小脑失调等疾病的致病蛋白质分子相互作用，参与致病过程。AD 伴随 β-淀粉样蛋白在病灶中央进行性堆积，研究结果显示，β-淀粉样蛋白能诱导神经元凋亡，但能被抗氧化剂阻断。已经在肌萎缩患者体内发现有与神经元凋亡抑制蛋白有关的基因突变，使神经元凋亡抑制蛋白缺乏，导致脊髓前角运动神经元凋亡，肌肉出现废用性萎缩。

2. 细胞凋亡与 AIDS 病　人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus，HIV）感染，可导致艾滋病（AIDS）。HIV 感染的宿主细胞膜表面，可表达 gp120，其受体存在于 CD_4^+T 淋巴细胞膜上。因此，当 gp120 与 CD_4^+T 淋巴细胞结合后，可诱导 CD_4^+T 淋巴细胞凋亡，导致免疫系统崩溃。另外，HIV 感染的外周血 T 淋巴细胞对 TRAIL 和 FasL 的诱导凋亡特别敏感。

3. 细胞凋亡与心血管疾病　人类的血管内皮细胞、平滑肌细胞和心肌细胞的凋亡是多种心血管疾病发生与演变的病理学基础。在动脉粥样硬化、心肌病、急性心肌梗死，以及心力衰竭中均伴随着细胞凋亡。近年来对动脉粥样硬化的研究发现，细胞凋亡主要以血管平滑肌细胞和巨噬细胞凋亡为主。窦房结、房室结和希氏束细胞发生过多凋亡，引起心脏传导系统障碍而致心功能不全。

小结

细胞衰老和死亡是有机体生命发展的必然阶段。衰老的细胞在生理生化等各方面都发生了变化，如细胞皱缩，膜通透性和脆性增加，核膜内折，细胞器数量特别是线粒体数量减少，胞内出现脂褐素等异常物质沉积和脂类、蛋白质、DNA 等细胞成分损伤，细胞代谢能力降低，最终出现细胞凋亡或坏死。衰老的发生不光受有机体本身基因的调控，也受到环境条件的影响。对于细胞衰老的原因也提出过各种假说。

细胞死亡有两种形式：细胞坏死和细胞凋亡。细胞坏死指在外来致病因子作用下，细胞生命活动被强行终止所致的病理性、被动性的死亡过程。细胞凋亡指在特定信号诱导下，细胞内的死亡级联反应被触发所致的生理或病理性、主动性的死亡过程。细胞坏死时，细胞膜和细胞浆中细胞器的质膜发生破裂，细胞浆外溢，细胞解体并引起周围组织发生炎症反应。然而，细胞凋亡时，质膜始终保持完整，胞膜内陷将细胞内容物包被成一些囊状小体，即凋亡小体，后者被周围细胞吞噬，不引起炎症反应。检测细胞凋亡可分为三方面：形态学检测、生化检测和流式细胞仪检测。

细胞凋亡是机体维持自身稳定的一种生理机制。机体通过细胞凋亡清除损伤、衰老与突变的细胞，维持生理平衡。某些致病因子可使细胞凋亡的基因调控失常，致使细胞凋亡减弱或增强，从而破坏了机体细胞的自稳态，最终导致各种疾病的发生。目前认为，细胞凋亡受许多基因调控；细胞凋亡的信号转导通路主要由死亡受体和线粒体介导。细胞凋亡的分子机制研究备受关注，细胞凋亡理论仍在不断的发展更新中。

（李继承）

第五篇 细胞工程

第十六章 细胞工程

生物工程（bioengineering）是指用生物体或其组成成分在最适条件下产生有益产物及进行有效生产过程的技术，所以又称为生物技术（biotechnology）。然而，只是到了近代，随着微生物学、细胞生物学、遗传学和分子生物学的发展，生物技术才在内容上、层次上有了迅速发展。如今它已包含有基因工程及基因组工程、酶工程、发酵工程、细胞工程、生化工程、微生物工程等诸多方面。因此，人们常将这些具有先进工艺并以现代化生物理论为基础而建立的技术称为现代生物技术（modern biotechnology），将诸如制造酱油、酒、奶制品等这些以自然过程为主的工艺称之为传统生物技术（traditional biotechnology）。

细胞工程（cell engineering），顾名思义，是将细胞生物学知识与生物工程学技术相结合而形成的一门新的学科领域。具体说来，它主要是通过细胞融合或拆合、核质交换或核移植、染色体或基因转移以及经由细胞培养和筛选，按照人们预先的设计，产生出新的细胞，并最终用于生产或医疗实践，或进行更深层次的研究及开发。

由于细胞工程在技术程序中避免了基因分离、提纯、剪切、拼接等分子水平的操作，一般只需将细胞遗传物质直接转移到受体细胞即可形成杂种细胞，因此，其过程相对比较简捷，不致造成对受体细胞的较大损伤，同时又可提高转移效率。此外，细胞工程不仅可以在动物之间、植物之间、微生物之间进行，还可以在动物与植物间、动物与微生物间、植物与微生物之间进行，从而可产生新的品种，甚至物种。目前，根据不同的操作对象，细胞工程又可分为动物细胞工程、植物细胞工程以及微生物细胞工程，本章主要介绍动物细胞工程。

正由于细胞工程有上述的那些优势，近年来发展极为迅速，尤其在细胞治疗、动物克隆、转基因动物等方面的研究与实践，已经引起全球的激烈竞争以及科学研究之外的关注。

第一节 细胞工程的主要相关技术

既然细胞工程涉及面很宽，所用技术方法也必定很多，但就总体来说，细胞工程可以认为是不同层次上的细胞拆合与重组工程。因此，我们在本节中按细胞不同层次的改造加以介绍。这些层次是细胞整体层次，如细胞培养、细胞融合；细胞器层次如核移植；以及分子层次，如基因转移等。

一、大规模细胞培养

细胞培养是细胞工程中最基本、最常用的技术之一。有关细胞培养的基本原理、术语

以及基本过程已在第三章叙述。本节只介绍大规模细胞培养。

所谓大规模培养（bulk culture）是指细胞的高密度（density）或高浓度（concentration）生长，培养容量在2L以上。目的是制备大量的细胞或是以此来生产更多的特殊细胞产物。一般说来，1×10^9~1×10^{10}个细胞可以在1~10L的容积内通过简单的搅拌器培养获得。但1×10^{11}~1×10^{12}个细胞的更大规模培养则需要一系列设备包括从100L实验室规模的发酵器，到100~1 000L容量的半工业小规模工厂，至于大规模的工业生产则需5 000~20 000L的生物反应器。

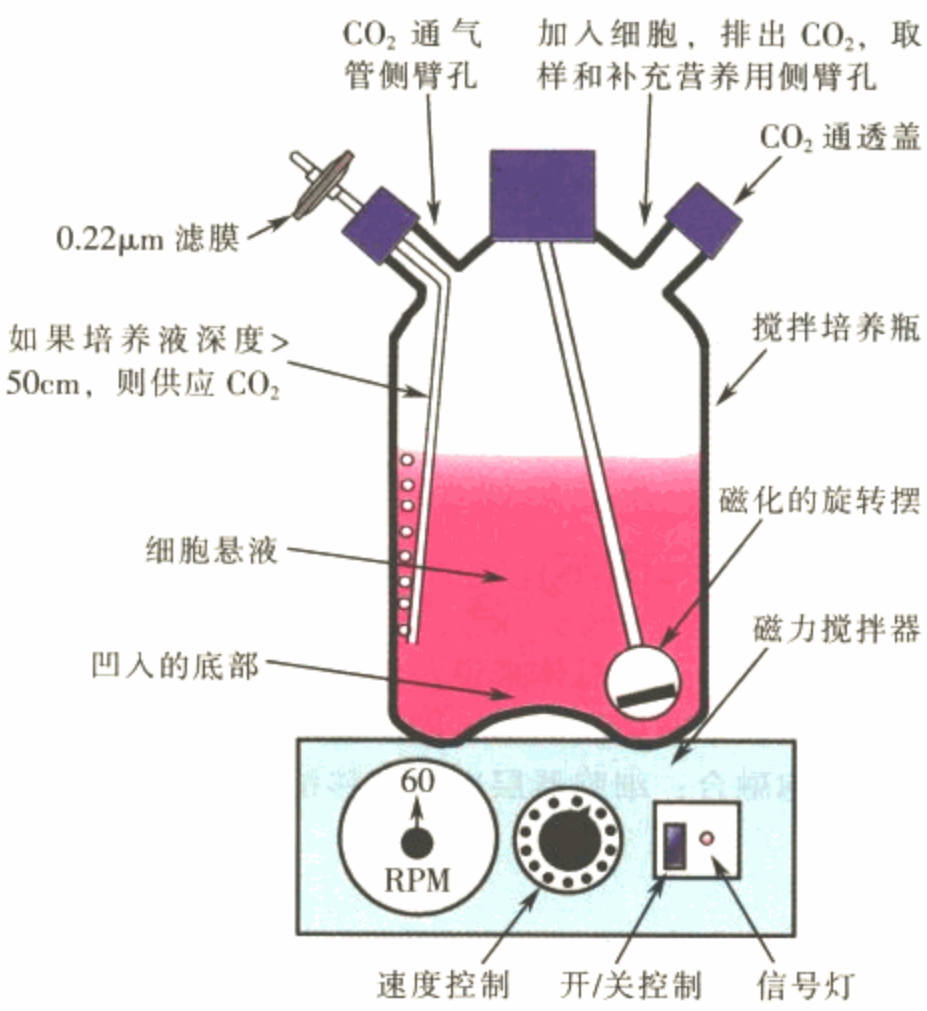
目前大规模细胞培养的方法很多，大致可分为悬浮规模培养和单层规模培养两大体系。但在实用上常分为悬浮培养、固定化培养和微载体培养三种方法。

（一）悬浮培养

细胞在培养液中呈悬浮状态的生长和增殖的培养方法称悬浮培养（suspension culture）。培养的容积可以为几升、几十升至几百升，甚至更多。图16-1是适合于8L容量的搅拌瓶培养（stirrer culture）。悬浮培养适用于血液及淋巴组织细胞、也适用于无需贴壁生长的某些细胞系和肿瘤细胞、骨髓瘤以及杂交瘤细胞的培养。多用于大量生产疫苗、细胞因子，如α-干扰素、白介素以及某些特殊细胞的基因工程产物。

悬浮培养的优点是设备相对比较简单而容积可选择性大。因此，所需成本低；另外，这种方式培养可连续收集培养细胞或其产物进行分析，也可适时地传代。还有一个优点是传代时无需消化，因此，细胞不会因酶和EDTA（乙二胺四乙酸，ethylenediamine tetra acetic acid）的消化以及激烈的机械力分散而受损伤。再者，由于细胞呈悬浮生长，而且处于不断搅动的动态生长过程之中，细胞的浓度（细胞数/ml）均一，因此，细胞的浓度可以得到及时有效的调控，细胞的产量也就比较恒定。

悬浮培养的一大技术关键在于要不断地震荡培养液以及连续地用CO_2和空气进行充气，以便使细胞均匀有效地进行代谢和气体交换（图16-1），同时不致产生细胞沉降。另外，当培养液中的血清浓度超过2%，尤其当向培养液充气时，溶液内易产生气泡。常需加入0.01%~0.1%抗泡沫剂。相反地，若为无血清培养，则需加入分子量约为10^5kD的1%~2%羧甲基纤维素，以增加培养液的黏稠性。



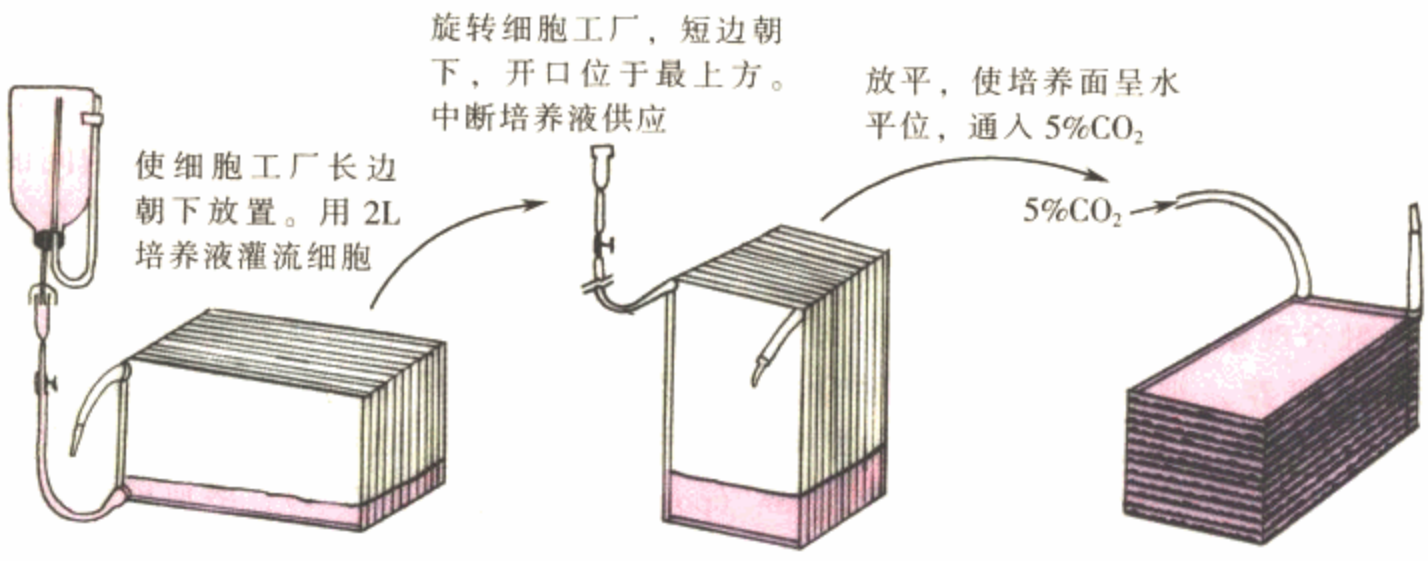
●图16-1 搅拌瓶培养

（二）固定化培养

使细胞限制或定位于特定空间位置的培养技术称之为细胞固定化培养法。动物细胞几乎都可采用固定化方法培养。固定化培养常分吸附法和包埋法两大系统。

吸附法是最简单的固定化培养技术，即让细胞在适当的条件下贴附在载体（如陶瓷颗粒、玻璃珠或硅胶颗粒）表面，或附着于中空纤维膜，或附着于培养容器表面。包埋法将细胞包埋于多聚物（如蛋白质、碳氢化物等）等海绵状基质中进行培养的技术。常用的蛋白质多聚物有明胶、胶原和纤维蛋白质等。

最简单的固定化培养系统是 Nunc 细胞工厂。该系统由一组长方形的 Petri 培养板组成，总面积可达 600~2 400cm^2（图 16-2）。此外常用的还有中空纤维灌流法（图 16-3）、螺旋卷膜培养等。

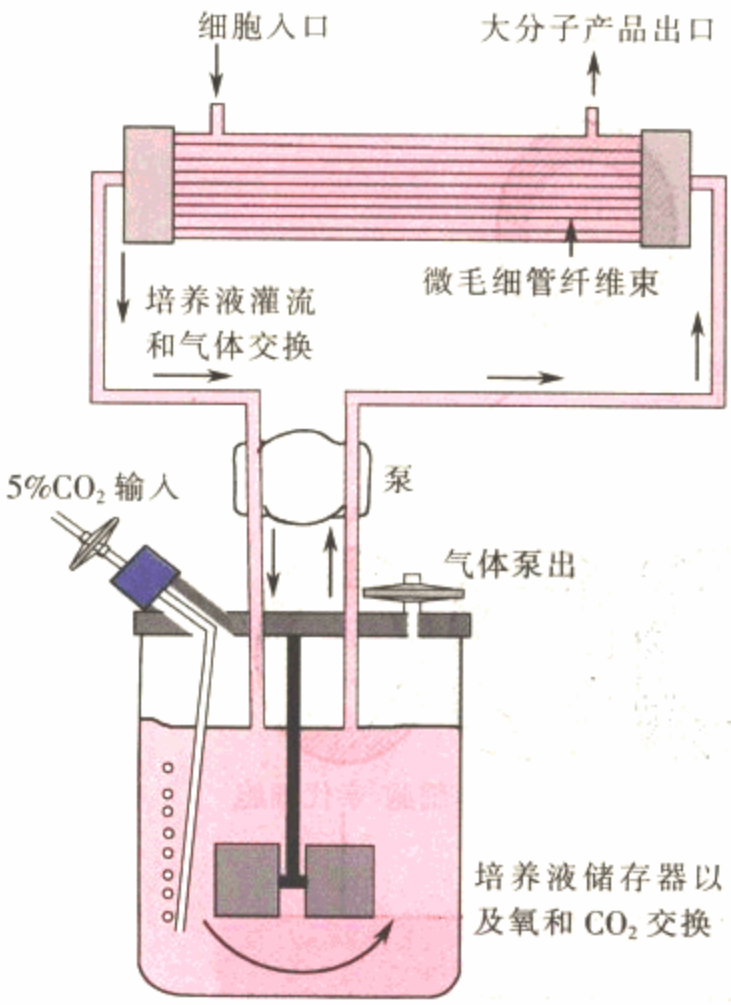


●图 16-2　填充式Nunc细胞工厂

固定化培养的优点在于细胞可维持在较小体积培养液中生长，但细胞的生长密度仍可较高。如 Nunc 工厂一次产量可高达 3×10^8~3×10^9 个细胞。此外，培养液易于更换以及进行实时的分析。

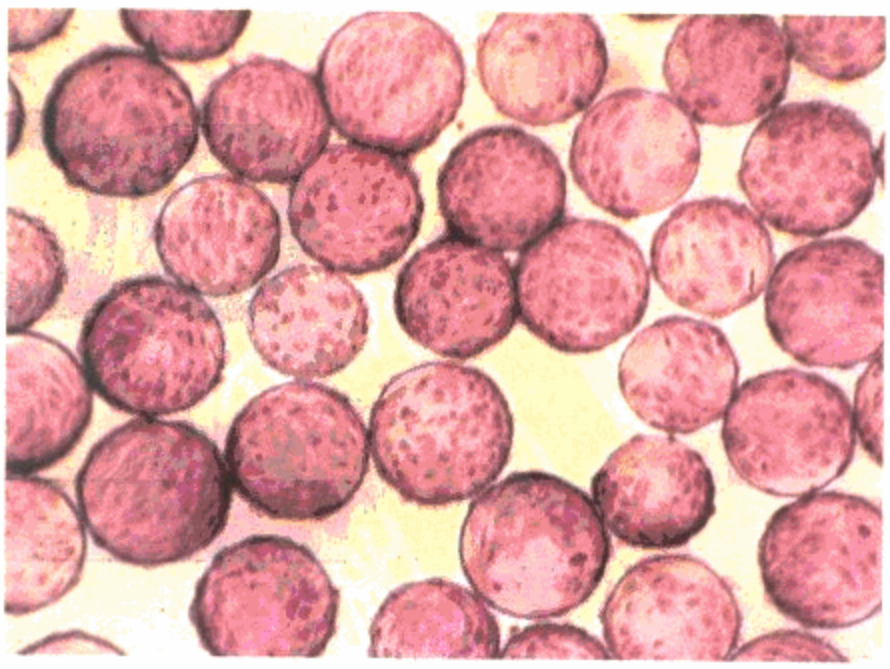
（三）微载体培养

微载体培养也称微珠培养，即让细胞吸附于微载体（microcarriers）表面进行生长与增殖的技术。细胞的贴附与细胞表面及微载体表面的化学-物理性质有关。微载体表面带有正电荷而细胞表面带有负电荷，这种静电吸引作用使细胞易于贴附于微载体表面（图 16-4）。诚然，用于制备微载体的材料首先应对细胞没有毒性作用；其次，应能够承受高压灭菌，而可重复利用。微载体的直径一般应在 40~120μm。目前被选用的材料有交联葡聚糖、塑料基质、



●图 16-3　中空纤维灌流（截面图）

培养液通过蠕动泵从培养液储存器循环到培养小室；在培养液储存器内进行换气和CO_2交换



●图 16-4　猴肾成纤维细胞Vero在微载体表面上的生长

聚苯乙烯、明胶、玻璃介质、胶原或胶原涂层、纤维素、生物玻璃等等。

二、细胞融合

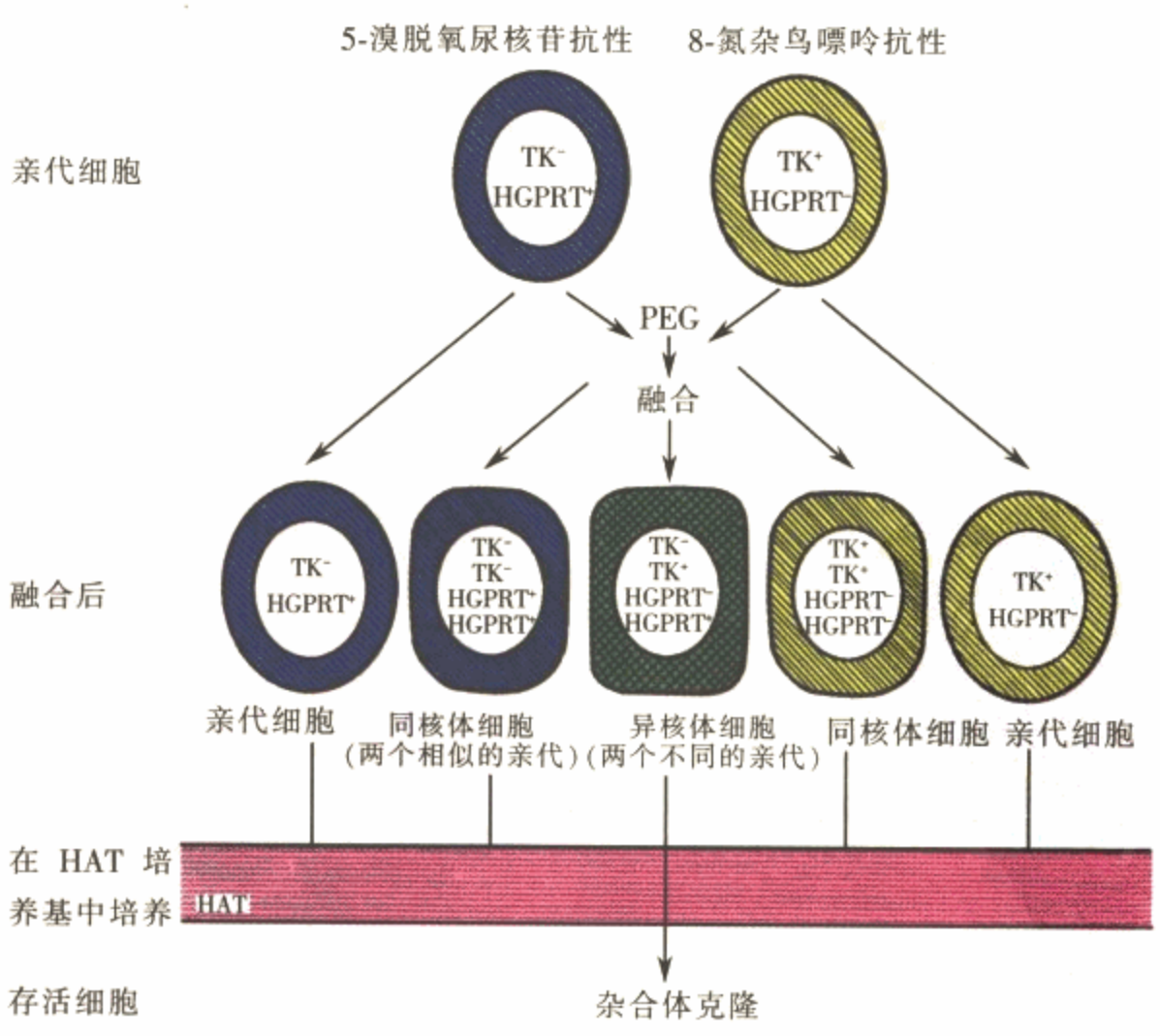
细胞融合（cell fusion），又称细胞杂交（cell hybridization），是指 2 个或 2 个以上的细胞合并成 1 个细胞的过程，所产生的细胞称杂种细胞（hybrid cell）。该过程涉及质膜的连接与融合、胞质合并、染色体、细胞器以及各种胞浆成分的混合。基因型相同细胞间的融合所形成的杂交细胞称为同核体（homokaryon），基因型不同细胞的融合所形成的杂交细胞称为异核体（heterokaryon）。

细胞融合现象最早是由 G.Barski 等人（1961）发现的。他们将高度恶性与低度恶性肿瘤细胞混合培养，观察到细胞自发融合能产生杂种细胞。不久，Y.Okada 和 J.Tadokoro（1962）发现利用紫外光灭活的仙台病毒可以促进细胞的融合。之后，人们又发现除了灭活的病毒之外，某些化学物质，如聚乙二醇（polyethyleneglycol，PEG）、溶血卵磷脂、油酸等物质以及物理性刺激，如电穿孔术（electroporation）等可以促进细胞的融合。

细胞杂交成功最为关键的技术之一在于对杂交细胞的筛选，即挑选出所需要的杂种细胞。通常有下列三种方法：

1. 抗药性筛选　常用 HAT 培养基筛选。HAT 是由次黄嘌呤（H）、氨基蝶呤（A）和胸腺嘧啶核苷（T）组成的培养基，其原理是当一种胸腺嘧啶核苷激酶缺陷（TK^-）细胞与次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺陷（$HGPRT^-$）细胞融合后所得的是一种既含有 TK 酶又含有 HGPRT 酶的杂种细胞，只有这种基因互补的细胞才具有在 HAT 选择培养基中存活下来的能力（图 16-5）。

2. 营养缺陷筛选　某些细胞在缺乏某种营养成分的培养基中不能存活，称之为营养缺



●图 16-5　杂交细胞的抗药性筛选

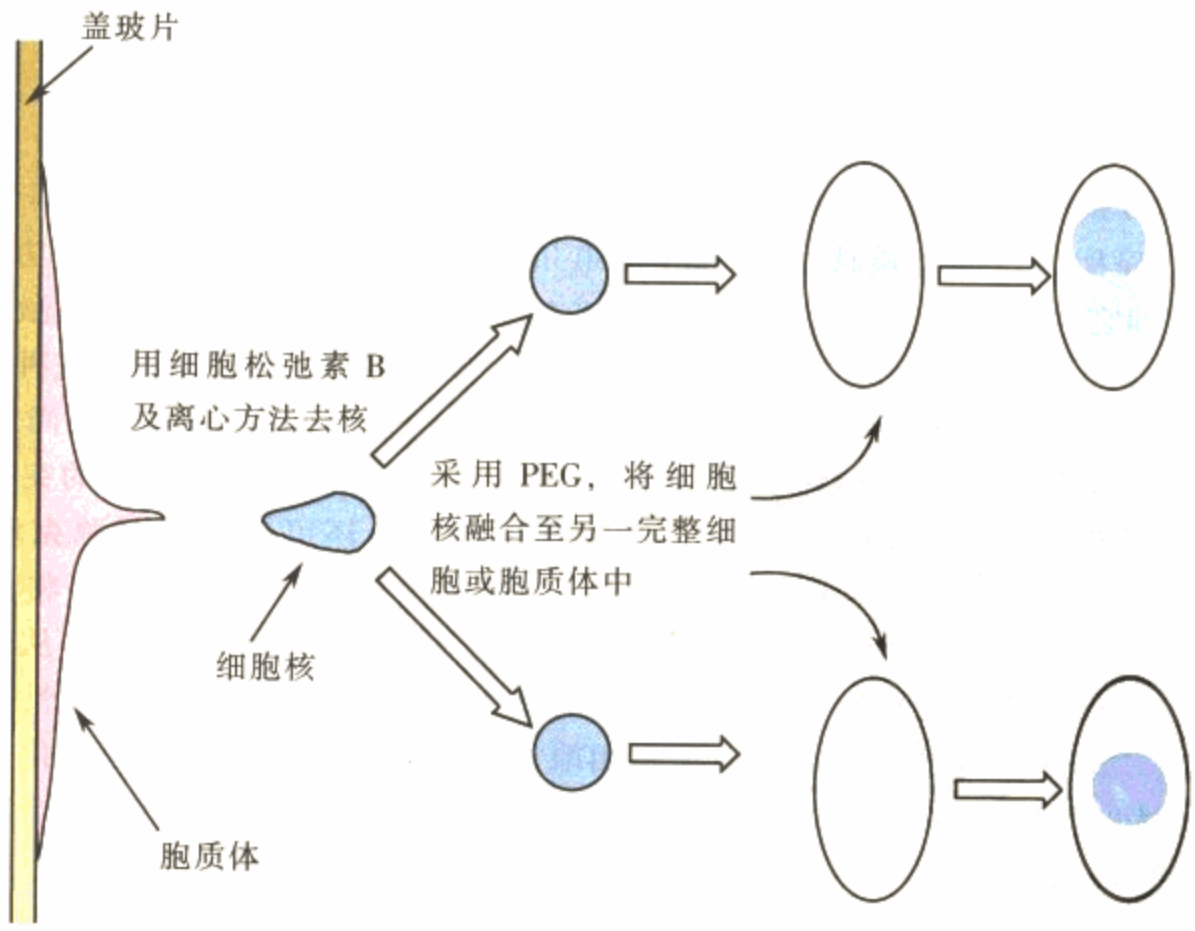
陷型细胞。如 5-溴脱氧尿嘧啶核苷缺陷（$BUdR^-$）细胞。因此可以利用分裂细胞的 DNA 中参入有 BUdR，而对紫外光更敏感的特性，用光照来杀伤，再将存活下来的缺陷型细胞培养于完全培养基中，使其增殖。

3. 温度敏感筛选　正常的哺乳动物细胞可在 32~40℃环境中存活。最适温度为 37~38℃。利用化学诱变的方法可使细胞发生突变，然后用非允许温度，即 38~39℃进行筛选，让那些温度敏感突变型存活下来，这样的细胞株称为热敏感突变株。反之，我们也可用低温来筛选，所得到的细胞为冷敏感突变株。温度敏感突变的机制在于温度依赖性基因的产物只有在一定的温度下才具有功能，非此温度它们则没有活性。

细胞融合技术的问世不仅为研究细胞的遗传变异、进化、发育等基础研究提供了有利的方法，而且它也是细胞工程的重要工具。因为以此技术，人们可以在种内、种间、甚至动植物间进行细胞融合，产生新的品种，甚至物种，更可以以此生产单克隆抗体这样的生物制剂，用于临床实践。

三、细胞核移植

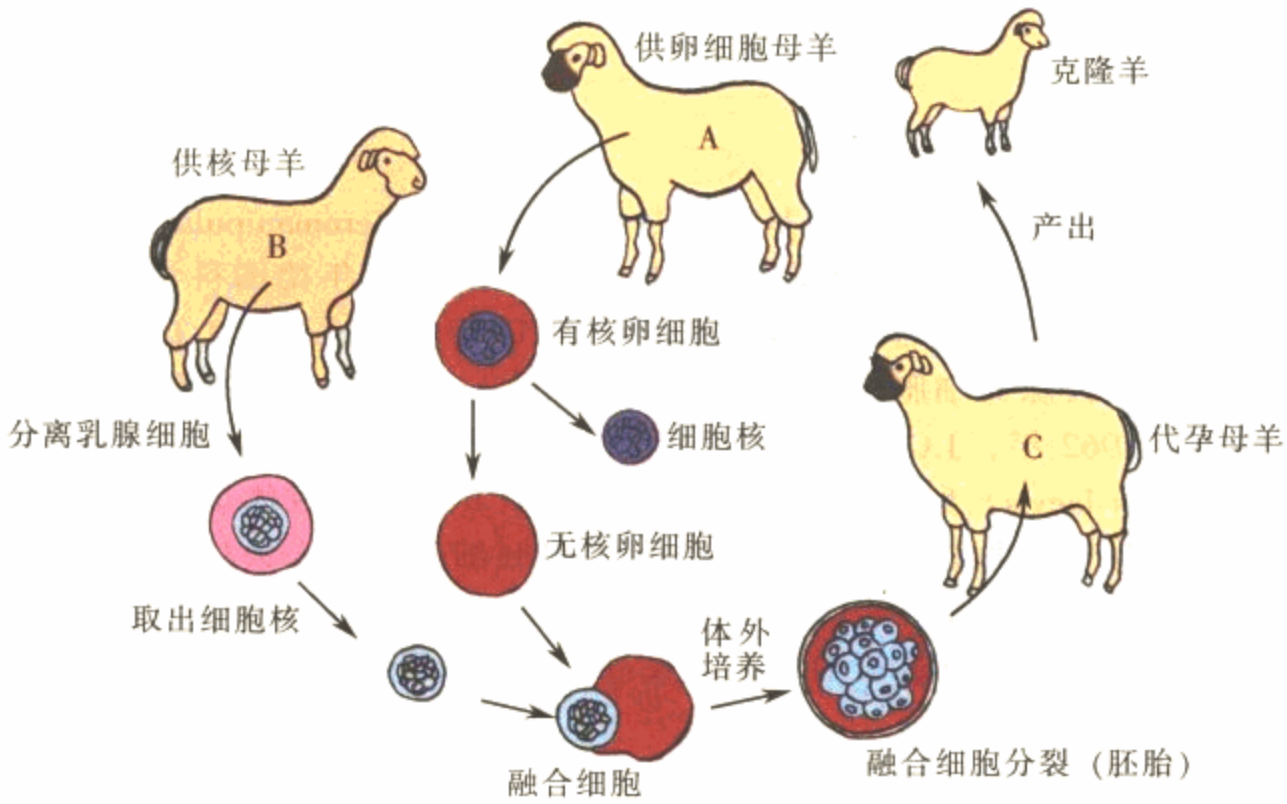
细胞核移植（nuclear transfer）是指通过显微操作（micromanipulation）将一个细胞的细胞核移植到一个去核的卵母细胞内的技术过程。1938 年德国科学家 H.Spenann 最早提出了进行两栖类动物核移植试验的设想，1953 年 R.Briggs 和 T.J.King 将一个已分化的细胞核移植入去除卵细胞核的豹蛙（Rana pipiens）卵中，观察到这种卵仍然可发育至豹蛙幼体。1962 年，J.Gurdon 将已分化的蝌蚪肠上皮细胞核移植入去除细胞核的非洲爪蟾(Xenopus laevis）卵中，观察到这种卵可以发育成为成体爪蟾。我国已故科学家童第周和叶毓芬于上世纪 60 年代初将金鱼的囊胚细胞核植入去核的未受精卵内，获得了正常的幼鱼。后来，人们发现，除了用显微操作仪（micromanipulator）获取细胞核外，利用游离的细胞核也可进行核移植（图 16-6），即用细胞松弛素（cytochalasin）处



●图 16-6　游离细胞核的获取及融合

理细胞结合离心方法使细胞脱核，然后经 PEG 将该细胞核融合进另一完整的细胞中，或者融合入一个胞质体内，这种杂交细胞称为胞质杂种（cybrid），以别于有核间融合所产生的杂交细胞。

在核移植的细胞工程研究与实践中，最令人瞩目的是克隆羊多利（Dolly）的出生。1997 年 2 月 23 日英国 Roslin 研究所宣布世界第一头克隆绵羊诞生。该克隆羊的产生过程如图 16-7 所示。首先从一个苏格兰母羊（A）的体内取出卵母细胞，将其核去掉成为无细胞核的卵细胞。再从另一头芬兰母羊（B）的乳腺上皮分离得到体细胞，将其细胞核取出，然后让它与上述去核的卵细胞融合，产生杂交细胞，这种杂交细胞在体外可以发育至囊胚期，然后再将该囊胚（胚泡）植入另一头苏格兰母羊（C）的子宫内，最后产生出小羊。由于该小羊的遗传特性来源于供核母羊（B），因此，该小羊是供核母羊的克隆。第一头苏格兰母羊主要是提供了细胞核发育所需的营养与环境，而第二只苏格兰母羊只是“代孕”母亲。



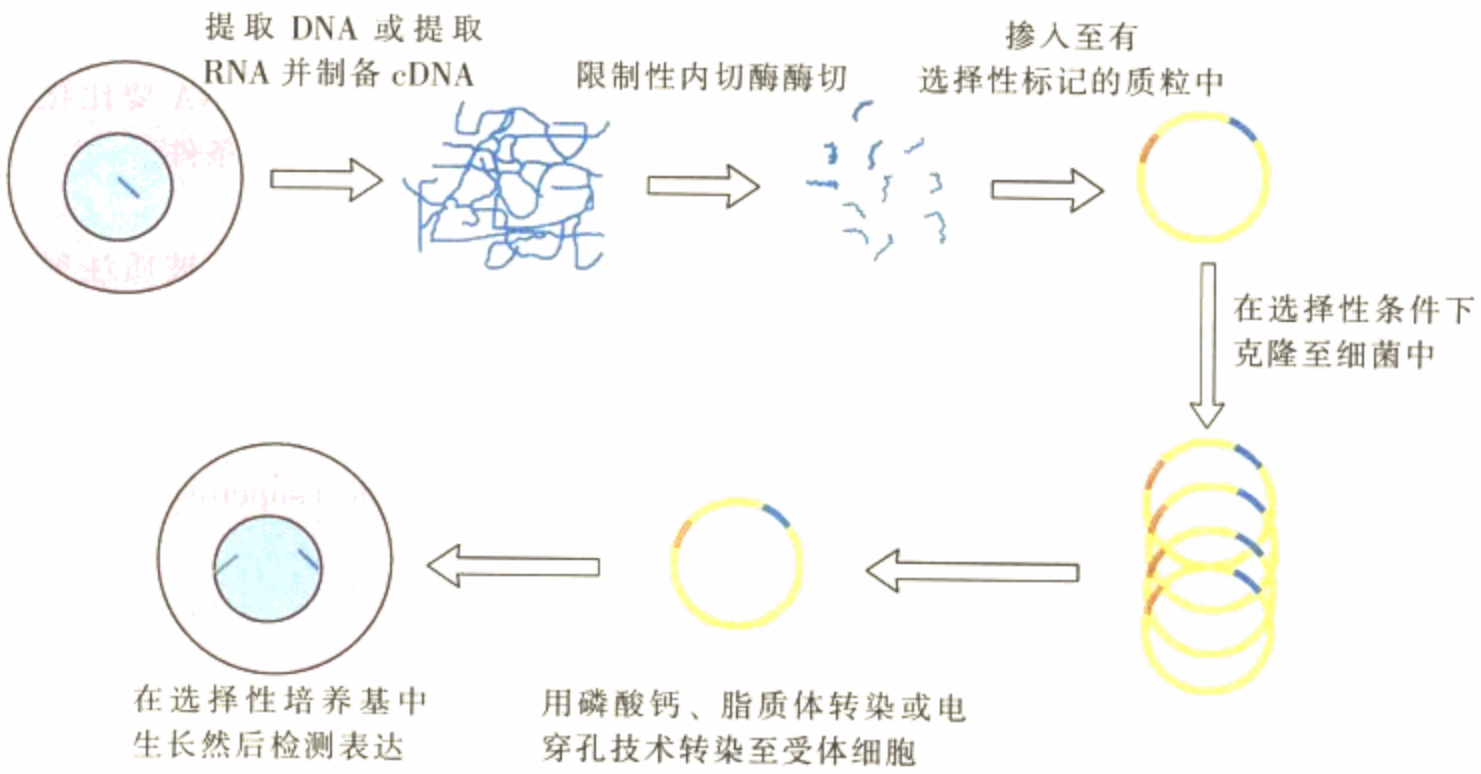
●图 16-7　克隆羊的产生过程

由于 Roslin 研究所 I.Wilmut 在克隆羊多利中所用的是乳腺细胞核，而不是胚胎细胞核，所以该过程称为体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer)。多利羊的成功在理论上具有重要意义，即它证明高度分化的成体体细胞核在成熟卵母细胞中仍然可以被激活，并且重新编程（reprogramming），另外，它还可以发育成为一个完整的个体。因此，这种核也仍然具有分化全能性（totipotency），但是人们对该细胞核-质间的相互作用过程及机制尚未阐明。

除了理论意义外，体细胞核移植更是细胞工程领域中的一个极为重大的突破，因为通过此技术人们可以进行同种动物克隆以及异种间的克隆，还可以进行同源克隆（homologous cloning），即将一个体的体细胞核植入同一个体的去核的卵母细胞种，将由此所获得的干细胞植入供核（也供卵母细胞）供体体内是不会有免疫排斥的。因此，从理论上讲具有极大的细胞治疗价值。这里有两个十分重要的概念值得提出，一个是治疗性克隆，一个是生殖性克隆。治疗性克隆指的是从内细胞团取得细胞，扩增及定向诱导分化后用于治疗某些特殊的疾病。生殖性克隆指的是体细胞核移植后，任其发育直至产生一个新个体。多利绵羊即是通过生殖性克隆产生的。生殖性克隆技术应用于人类的实践即为克隆人。对此，世界多数国家，包括我国政府均坚决反对，但赞同治疗性克隆的研究，因为它可以造福多种疾病的广大患者。

四、基因转移

基因转移（gene transfer）指的是将外源基因导入受体细胞并整合至受体细胞的基因组中，使之遗传性状及表型发生一定改变的技术。通过此过程人们可以选择出所需的新型细胞，乃至新的个体。若外源基因不但能在动物体内表达，并且可以遗传，则该动物称为转基因动物（transgenic animal）。一般说来该技术包括如下过程：①选择与提取外源目的基因；②用一定的方法将外源目的基因导入受体细胞；③对整合有目的基因的细胞进行筛选、扩增及鉴定；④若受体为卵细胞，则进行体外培育，并植入合适的动物子宫内；⑤筛选并获得转基因动物以及进行后续的所需研究。由上可知基因转移是本技术的核心过程，图 16-8 示转基因的基本步骤。



●图 16-8　转基因的基本步骤

转基因的方法很多，通常可分为：①物理学方法，它包括电穿孔法、显微注射法、裸 DNA 直接注射法等；②化学方法，包括 DEAE-葡聚糖法、磷酸钙共沉淀法、脂质体包埋法等；③生物学方法，包括病毒介导法、体细胞核移植法、精子载体法以及胚胎干细胞转染法等。下面简述三种常用的技术。

（一）磷酸钙介导的 DNA 稳定转染

1973 年 F.L.Graham 等最早提出用磷酸钙将基因导入哺乳动物细胞的技术，由于该方法操作简单，无需昂贵的设备，迄今仍被实验室广泛采用。其原理及基本过程是将氯化钙与外源 DNA 混合，然后将其加入到含磷酸根离子的溶液中，即可形成钙-磷酸-DNA 共沉淀物，接着，该沉淀物被培养的细胞摄取，DNA 整合入细胞基因组中，并最终得到表达。

多种因素可以影响磷酸钙介导的转染效率，其中包括细胞的生长状态（一般以 70%汇合为佳）、外源质粒 DNA 的纯度、所形成的磷酸钙沉淀颗粒的大小，以及溶液 pH。为了保证 DNA 的高纯度，常通过特殊的层析提纯或 CsCl 超速离心纯化。

（二）脂质体介导的转染

1987 年 P.L.Felgner 等建立了以阳离子脂质体介导的细胞 DNA 转染方法，其原理及基本过程是以一种多价阳离子脂质体（lipofectamine）取代单价阳离子载体，当 DNA 与脂质体通

过离子相互作用时，可被直径为600~1 200nm阳离子单层脂质体包被，形成复合物，该复合物可与培养细胞的细胞膜融合，使DNA进入细胞并整合至受体细胞的基因组中并得以表达。

与其他转染方法相比，阳离子脂质体的主要优点在于转染成功率较高，70%~80%的离体细胞可以瞬时表达外源基因。该方法还具有适应性广，细胞毒性较低的优点。此外，该方法还可用于大片断DNA、RNA、寡聚核苷酸、蛋白质等转染。但脂质体作转染试剂比较昂贵，不利于大规模使用。

（三）电穿孔法

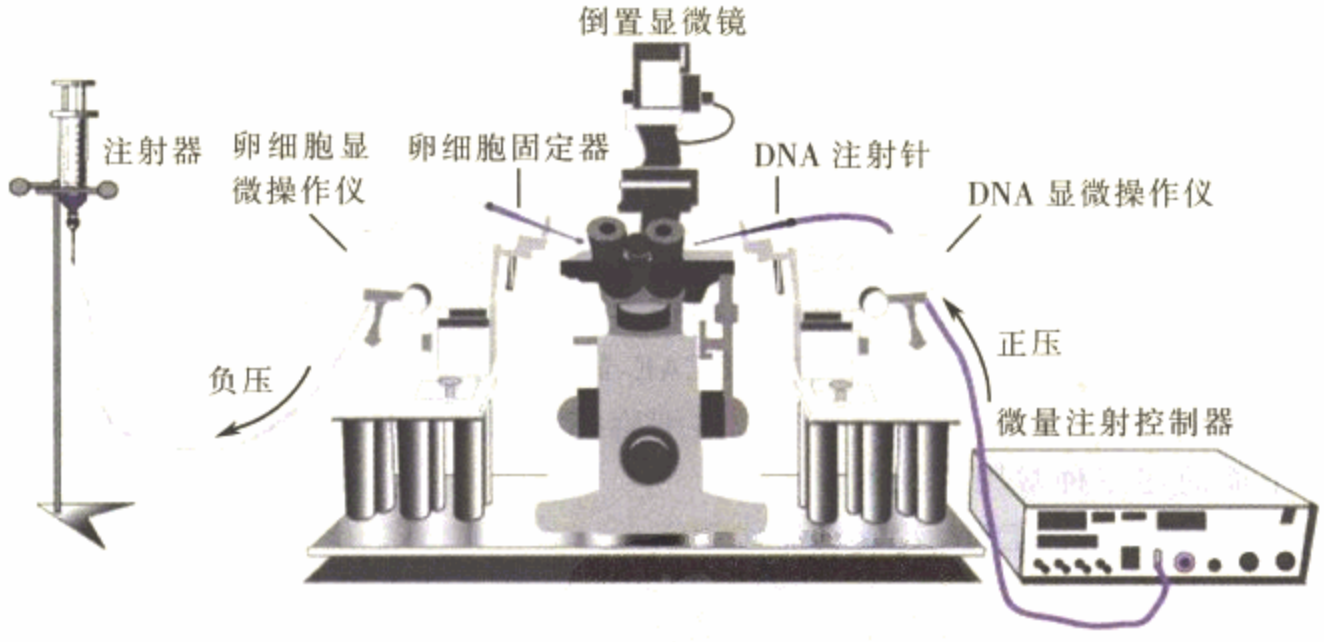
当把高浓度细胞悬液短暂地暴露于高电压时，DNA则可通过高电压在细胞膜上所形成的小孔进入细胞内，然后整合入细胞的基因组并得到表达。电穿孔方法可用于对化学法转染不敏感的细胞。在实践中，一般都选择恒定的脉冲，然后在500~1 500kV/cm的场强下轰击细胞。电穿孔通常在室温下进行，然后将细胞置于冰上，以延长细胞膜孔道的开放时间。一般情况下，经轰击后能有20%~50%的细胞可以存活下来。

由于贴壁生长的细胞必须附着在培养皿表面才能生长，因此，与贴壁生长的细胞相比，悬浮细胞更适合用电穿孔法进行转染。另外，该方法所需的细胞及DNA要比化学法更多，并且不同细胞间的最佳转染参数差异较大，因此常需摸索最适实验条件。

（四）显微注射法

该方法主要用于制备转基因动物，即在显微操作仪下，实验人员通过玻质注射针将DNA迅速注入受精卵内，通常为注入雄性原核内或者在其附近，然后将受精卵移植至假孕动物的输卵管中，最后产生转基因动物。

该方法需要装备较昂贵的显微操作仪，操作人员必须经过培训方能操作自如，保证一定的成功率。此外，由于成熟的卵母细胞数量少，更需用超数排卵（superovulation）技术方能获得较多的卵以供实验（图16-9）。



●图16-9 显微操作仪工作原理示意图

（五）病毒转染法

这是一种通过病毒感染的途径将外源目的基因导入受体细胞的方法。根据受体细胞的类型不同，可选择具有不同宿主范围和不同感染途径的病毒基因组作为转化载体。常用的病毒载体包括DNA病毒载体（腺病毒载体、腺相关病毒载体、牛痘病毒载体等）和逆转录病毒载体等。用作基因传导的病毒载体均为缺陷型的病毒，感染细胞后仅能将基因组整合至细胞，但不能产生包装的病毒颗粒。在病毒载体中，比较常用的是反转录病毒载体和腺病毒载体。

反转录病毒（retrovirus）是一种单链 RNA 病毒，它进入细胞后，在反转录酶作用下，RNA 反转录为 DNA，由于反转录病毒的长末端重复序列（LTRs）具有转录启动子的活性，因此将外源 DNA 连接到 LTRs 下游可进行重组，再包装为高滴度的病毒颗粒可直接感染受精卵，或者可注射至囊胚腔中，携带外源基因的反转录病毒 DNA 便可整合入受体的基因组内。腺病毒为线型双链 DNA，无包膜，其优点是安全性好，不整合入人染色体，不会导致肿瘤发生。此外适用的受体细胞广，外源基因在载体上容易高效表达。

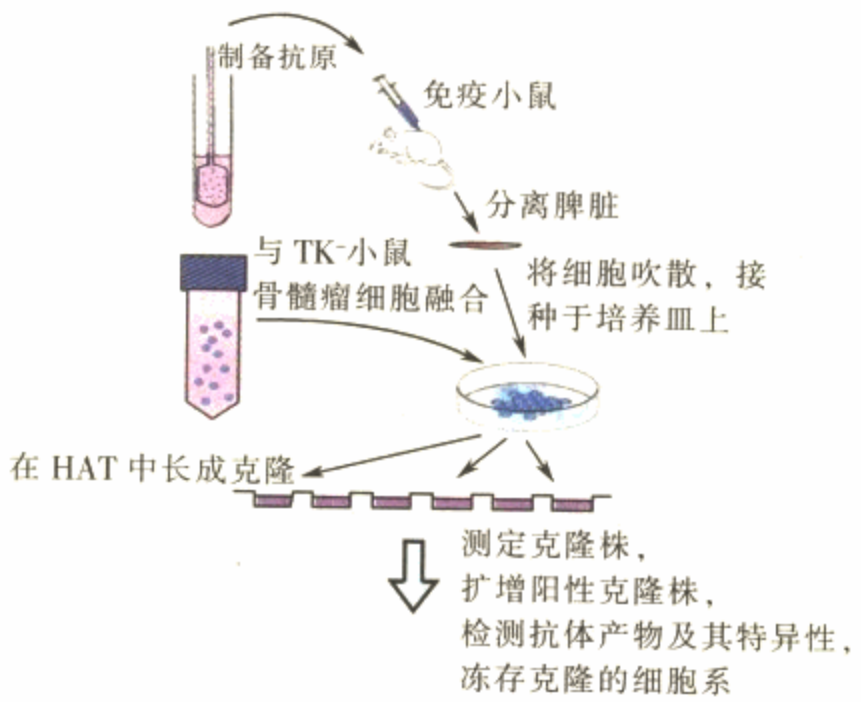
第二节　细胞工程的应用

由于借助细胞工程技术可对细胞的遗传表型进行定向改造并获得新型细胞，以至新的个体，因此，无论是细胞本身或是细胞的产物在医学实践中均具有广阔的应用领域，尤其是干细胞的研究与技术的兴起与发展，为治疗人类某些以往难以治疗的疾病开辟了前所未有的前景。

一、单克隆抗体的制备

自 1975 年 G.Kohler 和 C.Milstein 创建杂交瘤（hybridoma）技术之后，单克隆抗体（monoclonal antibody）已成为科学研究和疾病诊疗中不可缺少的重要工具，它也成为细胞工程中卓有成效的支柱技术之一。

经典的单克隆抗体制备方法是借助于聚二乙醇将不分泌抗体的骨髓瘤细胞与分泌抗体的 B 淋巴细胞进行融合得到杂交瘤。由于骨髓瘤细胞缺乏 DNA 合成所必需的次黄嘌呤鸟嘌呤核糖转移酶（HGPRT）或胸苷激酶（TK），因此在含次黄嘌呤（H）、氨基蝶呤（A）、胸苷（T）的选择培养基（HAT）中不能存活。另一方面，从脾脏分离得到的 B 淋巴细胞如不与骨髓瘤细胞融合，则培养数天后也会死亡。只有 B 细胞和骨髓瘤的杂交细胞才能在 HAT 选择培养基中存活（图 16-10）。它们从双方亲代细胞中获得遗传信息，因此，杂交瘤细胞一方面可如同骨髓瘤细胞那样无限生长，另一方面又如同 B 淋巴细胞那样分泌抗体。由这种杂交瘤细胞产生的抗体称为单克隆抗体，它是一种免疫球蛋白。用 ELISA 方法可筛查杂交瘤培养上清液中的抗体，并对阳性细胞进行亚克隆（sub-clone），确定它们产生抗体的特异性。由于这种抗体是针对单一表位（epitope），因此它对于特定抗原具有高亲和力和特异性。



●图 16-10　杂交瘤的产生

利用小鼠腹水和离体悬浮培养方法可在体内（*in vivo*）或体外（*in vitro*）大量制备单克隆抗体。杂交瘤细胞也可在多种中空纤维及发酵培养系统进行大规模培养。基于单克隆抗体的高度特异性，它在生物医学研究、临床诊断和治疗方面都得到了广泛的应用。

二、药用蛋白的生产

用生物工程技术生产的制剂通称为生物制品，其中生产药用蛋白是重要的领域之一。

用细胞反应器或动物反应器来生产有许多优点，如投资少、污染少、工艺相对简单，而且产品的特异性较高等。

按照工程细胞类型不同，细胞工程的表达系统可分为细菌、酵母、昆虫以及哺乳动物细胞四大类。每一类表达系统均有其自身特点和适用范围。本节介绍哺乳动物细胞生物反应器和动物生物反应器。

哺乳动物细胞生物反应器（下称细胞反应器）是指在人工条件下，高密度大量培养动物细胞并生产有应用价值的细胞蛋白质产品的技术及其设备。本章第一节中所介绍的细胞培养系统均属于细胞反应器范畴。20 世纪 90 年代初，美国宇航局的生物反应器（NASA bioreactor）即为一种旋转培养系统，它以一定的速度转动使得不会发生细胞沉降，并且细胞往往形成三维聚集体，这被认为可以增加产品的生成，当停止转动时，聚集物沉降，此时可收集细胞以及同时更换新鲜培养液。

用生物反应器已可生产多种疫苗（口蹄疫苗、狂犬病毒疫苗、脊髓灰质炎疫苗、牛白血病病毒疫苗、乙型肝炎病毒疫苗、疱疹病毒Ⅰ型及Ⅱ型疫苗、巨细胞病毒疫苗等）、蛋白因子（凝血因子Ⅷ和Ⅸ、促红细胞生成素、生长激素、IL-2、神经生长因子等）、免疫调节剂（α、β、γ干扰素）以及单克隆抗体。

以转基因动物作为一种生物反应器来生产蛋白质最早由美国 K.Gordon 等人于 1987 年报道，他们以小鼠乳腺细胞表达组织型纤溶酶原激活因子（tPA）；1988 年英国 A.J.Clark 等报道绵羊乳腺可以分泌人 α-AAT。无疑以乳腺作为生物反应器具有许多优点：首先，动物乳腺是一个自我封闭的系统，乳腺细胞表达的蛋白质绝大部分随乳汁分泌，不会进入机体的血液系统中，这样便可以避免大量表达的外源型蛋白质干扰宿主动物的生理状况以及可能造成的伤害；此外，不论是转基因牛、绵羊、山羊、兔、或是猪等，它们乳汁的产量较高，而且源源不断，因此，可以获得较多的蛋白产品。除了乳腺之外，血液、尿液也常是收集蛋白产品的原始材料。

三、疾病的细胞治疗

细胞治疗是将体外培养的具有正常功能的细胞植入患者体内（或直接导入病变部位）以代偿病变细胞（或细胞丢失）所丧失的功能。另外，也可采用基因工程技术，将所培养的细胞进行体外遗传修饰，然后再将其导入体内，治疗机体的疾病。如果培养的细胞形成三维空间结构的复合体，类似于正常人体细胞，则可植入机体器官的损伤部位，恢复器官或组织的功能或部分功能。这一组织替代的技术则称之为组织工程。

（一）干细胞工程

干细胞是指具有长期（或无限）自我更新、并能分化产生某种（或多种）特殊的细胞的细胞生物学特性的原始细胞。它们是个体的生长发育、组织器官的结构和功能的动态平衡以及其损伤后的再生修复等生命现象的细胞学基础（详见第 17 章）。正因为干细胞具有这些特性，因此可以用来治疗某些疾病，以替代机体内因细胞衰老、退化、死亡或丢失所导致的功能障碍性疾病。干细胞的获取、诱导分化以及在疾病治疗中的应用称之为干细胞工程。

1. 神经系统疾病 不少神经系统的疾病都涉及神经元的损伤或死亡。神经干细胞移植为诸如此类的神经系统疾病的治疗带来了曙光。

帕金森病是由于大脑黑质（substantia nigra）多巴胺分泌性神经元退化所引起的一种疾病。黑质是中脑内一个很小的区域，它有协助控制运动的功能，一旦该区的神经元死亡，它们便不能再生。黑质细胞释放神经递质多巴胺（dopamine），多巴胺不足或缺如，

病人便会出现运动障碍，即不随意肌的颤搐及反复的肌肉运动。神经干细胞具有被诱导分化成为多巴胺神经元的潜能，将体外扩增的人神经干细胞移植至大鼠帕金森病大鼠模型中，能在大鼠体内分化为成熟的多巴胺神经元，并可建立突触连接，改善大鼠模型的帕金森病的症状。帕金森病人接受人胚中脑组织移植已有十余年的历史，这也为干细胞治疗提供了研究与实践的基础。

2. 心肌梗死　这是由冠状动脉阻塞引起的心脏疾病。迄今已证明人胚胎干细胞可被诱导形成胚胎样体，然后自发生成心肌祖细胞，它们不但具有心肌特征，而且当这些细胞聚集在一起时，它们可起始有规律的搏动。这为心肌梗死的治疗提供了前提（见第 17 章）。迄今，骨髓源干细胞移植的临床研究已在多个国家中开展，其中包括我国、德国、以色列及韩国等国家。

3. 糖尿病　全球大约有 2 亿人患糖尿病。该病的特征是机体不能分泌（或分泌不足）或不能（或有效）利用胰岛素所导致。2001 年美国科学家 N.Lumelsky 从小鼠胚胎干细胞中获得可分泌胰岛素的细胞，将它们注入糖尿病小鼠的脾脏内，24 小时后发现小鼠不仅可产生胰岛素，血糖水平也恢复正常。以色列学者 S.Assady 证明人胚胎干细胞也可诱导出分泌胰岛素的细胞，这为糖尿病干细胞移植治疗提供了细胞源泉。此外，用异种细胞（如猪）进行移植的研究也在进行中。所以选择猪，理由在于猪的生理、解剖结构与人有一定的相似性。猪胰岛素与人胰岛素结构也极相似。

4. 其他疾病　随着对干细胞研究的逐步深入，也为其他疾病的细胞治疗提供前景。事实上早在 20 世纪由 E.D.Thomus 提出的骨髓移植其本质是干细胞治疗。如今骨髓移植可用于白血病、再生障碍性贫血以及某些血液遗传性疾病的治疗。肿瘤放疗或化疗后对造血系统的损伤也可用造血细胞移植的方法来重建及恢复其造血的功能。

（二）工程化细胞的运用

工程化细胞是指采用基因工程手段对体外培养的细胞进行遗传修饰，并由此筛选出可以稳定高水平地表达外源基因的细胞系，进而将细胞进行体外扩增，然后将它们植入患者体内或直接植入病变部位，从而达到治疗效果。由于干细胞和一些永生化的细胞具有可以长期增殖的特性，因此是用于基因治疗的良好细胞载体。诚然，为了避免免疫排斥以及可能的潜在致病因素的影响，载体细胞最好是同一个体的，即用于遗传修饰的细胞最好来源于病人本身。

2001 年，A.Martinez-Serrano 利用温度敏感性 Hi-B5 永生化细胞建立了高效神经生长因子（NGF）分泌细胞系。该细胞系含有神经生长因子基因的多个拷贝。将这种细胞移植至切断穹隆的大鼠纹状体及中隔后，仍能持续分泌神经生长因子，并使 90%的胆碱能神经元得到恢复。同时，移植的细胞也能很好地在宿主动物脑组织中存活，并且在结构上已完全整合于受体的脑组织中。此外发现所移植的工程化细胞还能分化为神经胶质细胞，这项研究显示工程化细胞的基因治疗在临床应用的可能性。

工程化细胞除了用于恢复神经元功能之外，癌症的工程化细胞治疗也是研究热点之一。人们希望，将来源于干细胞的可杀伤癌细胞的特殊细胞锚定到特定的癌细胞，从而直接将癌细胞杀伤，或是将修饰癌细胞的药物，其中包括可引起癌细胞凋亡的因子，输送至癌细胞，使癌细胞死亡。

在众多的干细胞中，骨髓间充质干细胞（bone marrow mesenchymal stem cells，BMMSCs）比较受到人们的青睐，认为它是一个较为理想的候选细胞。原因是间充质干细胞具有较大范围的跨系分化能力，此外，骨髓间充质干细胞的来源、分离和培养都比较容易。还可以将血管内皮生长因子（VEGF）基因导入骨髓间充质干细胞，再诱导其分化为心肌细胞后植入心肌梗死区。植入的细胞一方面可以替代死亡了的心肌细胞，同时由于 VEGF

的作用，可以刺激周围血管的形成。这种将细胞治疗与基因治疗相结合起来的方法，为众多疾病治疗带来新的前景。

（三）组织工程

组织工程的概念是由 R.Langer 和 J.Pavcanti 于 1987 年提出和确定的，是指运用细胞生物学和工程学的原理，研究和开发能修复或改善损伤组织的形态和功能的生物替代物，将其填入机体，恢复失去或下降的功能。组织工程的基本原理和方法是将可体外扩增的正常组织和细胞吸附于一种生物相容性良好的，并可被机体吸收的生物材料上，从而形成具有三维空间结构的复合体。然后将细胞-生物材料复合体植入机体器官的病损部位，或者完全替代受损的器官。细胞在生物材料被机体逐渐吸收的过程中形成了新的具有相应形态结构和功能的器官或组织，从而达到修复创伤或是重建的目的。组织工程的主要研究内容包括如下几个方面：①种子细胞的性质；②细胞外基质（extracellular matrix，ECM）替代物的研制与开发；③组织工程化组织（tissue engineered tissue）对各种病损组织替代的研究。其中最主要的是多大程度可恢复或代偿机体失去的功能以及是否有免疫排斥等问题。

1. 组织工程皮肤 组织工程皮肤可分为三大类型：表皮替代物、真皮替代物和全皮替代物。表皮替代物由生长在可降解基质或聚合物膜片上的表皮细胞组成；真皮替代物是含有细胞或不含细胞的基质结构，用来诱导成纤维细胞的迁移、增殖和分泌细胞外基质；全皮替代物包含以上两种成分，既有表皮又有真皮结构。一般认为利用表皮干细胞或者混合有表皮干细胞的细胞构建的真皮中含有表皮干细胞，它们保持着自我更新能力，有利于反映皮肤的修复与维持。另外还可以形成较厚的表皮层，恢复皮肤对机体的保护功能。

2. 组织工程骨和软骨 骨组织工程多用 BMMSCs 作为种子细胞。常在 BMMSCs 培养过程中加地塞米松、维生素 C 或 β-甘油磷酸钠等诱导它为成骨样细胞，并用骨钙素、钙结节形成、碱性磷酸酶、Ⅰ型胶原蛋白等来鉴定。将这种细胞按工程程序培养即可形成组织工程骨。此外，也可将 BMMSCs 注入靶组织，它在局部微环境（niche）下发生转分化，形成骨或软骨。人 MSCs 的培养基中加入一定量的转铁蛋白、丙酮酸、胰岛素、地塞米松、转化生长因子等，则 MSCs 可成为呈Ⅱ型胶原阳性的软骨细胞。

3. 人工工程血管 将内皮细胞和平滑肌细胞联合种植于多孔三维的多聚 L-乳酸支架上，可导致血管的形成。也有学者用成肌细胞（myoblasts）、胚胎成纤维细胞以及内皮细胞联合种植于多聚 L-乳酸（PLLA）和多聚乳酸-甘醇酸（PLGA）构成的可降解网格支架上，观察到血管的形成。工程血管的形成将为器官移植的血液供应提供了前提条件。

4. 其他工程器官 其他组织或器官由于体积大、组成细胞多以及功能的复杂等因素在实施中还存在一定的困难，但已有组织工程膀胱、组织工程肝脏的报道。随着对种子细胞及其分化潜能以及支架基质等方面的研究进展，组织工程器官的名单无疑会越来越宽，将对人类目前尚无法治疗的疾病带来光明前景。

小结

人类自古以来都与生物工程相依相伴。由蒙昧时期不自觉的行为，发展到利用剩余的粮食或鲜奶制造啤酒、奶酪、面包这类简单的发酵与酿造技术，这些以自然过程为主的工艺称为传统生物技术。随着人类进入文明社会，生物工程技术应运而生。

细胞工程是现代生物技术的主要技术之一，它通过细胞融合或拆合、核-质交换或核移植、染色体或基因转移以及细胞培养和筛选，按照预先的设计，产生新细胞的技术。可在同种物种，甚至不同物种间进行。

大规模细胞培养是细胞工程的基本技术，包括悬浮培养、固定化培养和微载体培养。悬浮培养主要用于大量生产疫苗、细胞因子，以及某些特殊细胞的基因工程产物。固定化培养适用于绝大部分动物细胞培养，细胞可在较小体积培养液中维持较高生长密度。微载体培养是让细胞吸附于微载体表面进行生长与增殖的技术。

细胞融合是细胞工程的重要工具，是将多个细胞合并成1个细胞的过程，通常用抗药性筛选、营养缺陷筛选及温度敏感筛选等方法获得融合细胞。它为研究细胞的遗传变异、进化、发育等基础研究提供了有利的方法，而且可用于生产单克隆抗体，以及临床实践。

细胞核移植是将一个细胞的细胞核移植到一个去核的卵母细胞的过程。其理论价值在于应用该项技术可以进行细胞治疗。

基因转移是将外源基因导入受体细胞并整合至受体细胞的基因组中，使之遗传性状及表型发生一定改变的技术。利用基因转移技术可获得转基因动物。常用的基因转移方法有磷酸钙介导的DNA稳定转染，脂质体介导的转染、电穿孔法、显微注射法和病毒转染法。

细胞工程最有成效的应用是单克隆抗体的制备、生产药用蛋白和细胞治疗。

细胞治疗是将体外培养的具有正常功能的细胞植入患者体内（或直接导入病变部位）以代偿病变细胞（或细胞丢失）所丧失的功能。由这一技术衍生的组织替代技术则称为组织工程。建立在干细胞基础上的细胞治疗与组织工程研究的不断深入将为多种人类难以治愈的疾病的彻底修复带来曙光。

（章静波）

第十七章　干　细　胞

干细胞（stem cell）一词，最早出现于1896年E.B.Wilson关于蠕虫发育的研究论文中，但对于干细胞的深入研究，主要发生在近几十年。20世纪60年代，发现了小鼠骨髓中有造血干细胞的存在，并认识到了它可以分化为不同类型的血液细胞。80年代初，小鼠胚胎干细胞（embryonic stem cell）被成功分离和培养，并证实了其具有形成三个胚层（外胚层、中胚层和内胚层）细胞的分化潜能。干细胞也由此开始引起了人们的广泛关注。进入90年代以后，人类胚胎干细胞和一些组织干细胞陆续被分离培养成功，而且对其生物学特性也开展了一些实验研究。由于干细胞在再生医学上的重要意义，它已成为目前生命科学和医学研究的热点领域。

目前一般认为，干细胞是一类具有自我更新（self-renew）和多向分化潜能的细胞，它存在于人体或动物个体发育各个阶段的组织器官中，是各种分化细胞或特化细胞的初始来源。干细胞是个体的生长发育、组织器官的结构和功能的动态平衡，以及其损伤后的再生修复等生命现象发生的细胞学基础。

第一节　干细胞概述

一、干细胞的存在与类型

人和动物的个体都来自于一个单细胞，即受精卵。受精卵经过卵裂、囊胚、原肠胚及器官发生等胚胎发育阶段，以及胚后发育过程，最终发育成为一个成熟的个体，直至衰老死亡。受精卵细胞的分裂即卵裂，在其分裂3次（即8细胞期）之前，所产生的每一个细胞（包括受精卵）都具有全能性，也就是说，如果将处于这种状态的任何一个细胞植入子宫后，它们都具有发育为一个完整个体的可能性。这种具有发育全能性的早期胚胎细胞，谓之全能性干细胞（totipotent stem cell）。随着发育的进行，早期胚胎形成一个中空的球性结构，称为胚泡。在胚泡内的一侧出现一个小的细胞团，即内细胞团（inner cell mess，ICM）。内细胞团细胞具有分化为成熟个体中所有类型细胞的潜能，但没有形成一个完整个体的能力（因为它们不能分化为胎盘和其他一些发育时所必需的胚外组织），这种早期胚胎细胞被称为多能性干细胞（pluripotent stem cell），习惯上称为胚胎干细胞（embryonic stem cell，ESC）。随着胚胎的继续发育，多能性细胞将进一步发生分化，其后代细胞的分化潜能也将进一步趋于“变窄”。在三胚层形成以后，那些存在于胚胎各组织器官原基中的干细胞，通常只分化为可参与其相应组织器官组成的细胞。如肝脏原基中的肝干细胞只具有分化为成熟肝细胞和胆管细胞的潜能，神经干细胞只具有分化为神经元、神经胶质细胞的潜能。这类在器官的发育过程中起着重要作用的干细胞被称为专能性干细胞（multipotent stem cell），或称组织特异性干细胞（tissue specific stem cell）。

已有许多证据表明，在出生后个体的组织中，仍然有干细胞的存在。这些干细胞通过有序的增殖与分化，以实现其所在组织中细胞的新旧更替，并维持组织器官结构和功能的动态平衡。由于这类干细胞存在于成体的组织中，而在一般的生理状态下，它们只能分化为其所在组织中的各种（或其中的几种）成熟细胞，故将其称为成体干细胞（somatic stem cell），或专能性成体干细胞（multipotent somatic stem cell）。在成体中，成体干细胞的数量

及其活跃程度与其组织的类型，以及其功能状态有关。例如，在造血系统、皮肤及小肠等具有旺盛细胞更新特性的组织器官中，其相应的成体干细胞通常是十分活跃的；而有些组织的干细胞在正常生理条件下则处于休眠状态，但当其组织受到严重损伤时才可被明显激活。例如，肝脏中的肝干细胞通常并不活跃，但在受到严重损伤后，肝干细胞便可迅速的增殖与分化，以适应其组织修复的细胞需要。

造血干细胞是首先被认识，并得到深入研究的成体干细胞。早在 1961 年，E.J.Till 和 E. McCulloch 首次通过小鼠脾集落形成实验，证实了小鼠骨髓中有造血干细胞（hematopoiesis stem cell，HSC）的存在。他们将小鼠的骨髓细胞悬液移植到受致死照射的小鼠后，发现这些细胞可以在受照小鼠的脾脏中形成结节，并发现结节中包括红细胞、粒细胞和巨核细胞的混合细胞群；在进一步的实验中，他们还证明了每个结节都来源于一个细胞，并由此得到了骨髓中存在可以重建造血系统的造血干细胞的证据。造血干细胞在所有骨髓细胞中所占的实际比例很少，但它们却具有强大的增殖和分化能力。有研究表明，一个单独的造血干细胞就可以重建整个造血系统。除以上所提及的造血系统、皮肤、小肠和肝脏外，也在神经系统、呼吸道、睾丸和胰腺等组织器官中证实了干细胞的存在。尤其是神经干细胞的发现，它从根本上推翻了长期以来认为“神经元没有分裂能力、损伤后无法修复”的观点。

二、干细胞的形态和生化特征

已有的证据表明，所有干细胞在形态学上都具有原始细胞的一些基本特征，其主要表现为细胞的体积较小（相对于所在组织中的细胞）、核/质比例相对较大，以及细胞质中各种细胞器（如内质网、高尔基复合体及线粒体等）不够发达等。干细胞的生化特性与其所存在组织的类型密切相关，如细胞角蛋白是特异性存在于上皮细胞中的细胞骨架成分，也常被用作上皮组织干细胞的标志分子。而且，干细胞的生化特性还与其分化程度有关。例如，造血干细胞的端粒酶（telomerase）活性很高（可达到造血系统肿瘤细胞端粒酶活性的水平），但当它分化为专能性前体细胞（multipotent progenitors，MPPs）后，其端粒酶活性便随之降低。在目前的研究中，干细胞的生化特性常被用作鉴定干细胞在组织中存在和评价其分化程度的标志。例如，胚胎干细胞表达阶段特异性胚胎抗原-1 (stage-specific embryonic antigens 1，SSEA-1)、TRA-1-60、TRA-1-81 和碱性磷酸酶等分子；神经干细胞表达中间纤维 nestin、EGF 受体和 FGF-2 的受体等分子。

干细胞可以根据其形态学特征和存在位置来辨认。例如，在果蝇的性腺和外周神经系统中，干细胞、过渡放大细胞（transit amplifying cell）和外周分化细胞有固定的组织方式。但是，对于大多数组织而言，干细胞的存在部位目前仍未确定，也没有发现与分化细胞截然不同的形态学特征。在干细胞的研究中，分子标记对于确定干细胞在特定组织中的位置有重要意义。同时，这些标记分子也可为认识干细胞增殖分化的分子机制提供线索。例如，表皮干细胞高表达 β_1-整联蛋白（β_1-integrin），由其介导的细胞与胞外基质的黏附对表皮干细胞的移行和分化有抑制作用。但是，不能仅根据细胞的形态和表面抗原来寻找干细胞，因为具有增殖和自我更新能力以及在适当条件下表现出一定的分化潜能才是干细胞的本质特征。

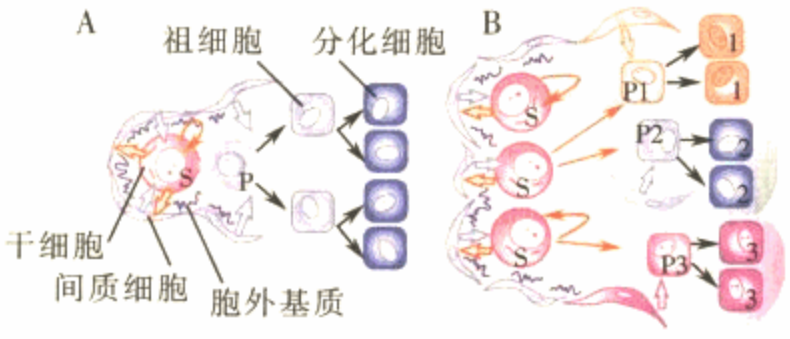
三、干细胞的增殖特性

1. 干细胞的增殖速率是缓慢的　当干细胞进入分化程序后，首先经过一个短暂的增殖期，产生过渡放大细胞。过渡放大细胞经若干次分裂后，便可产生分化细胞。过渡细胞的

生物学意义在于它可以减少干细胞的分裂次数，而产生较多的分化细胞。细胞动力学研究表明，干细胞本身的增殖速率通常是很慢的，而组织中的那些过渡细胞的分裂速度则相对较快。如小肠干细胞较其过渡细胞的分裂速度大约慢一倍。目前认为，干细胞的这种缓慢增殖的生理意义是，有利于干细胞对特定的外界信号作出反应，以决定其细胞是进入增殖状态，还是进入特定的分化程序。而且，这种缓慢增殖特性，还可以减少基因发生突变的危险，使干细胞有更多的时间发现和校正复制错误。对于那些无法修复的细胞，则进入凋亡程序。有人认为，干细胞的作用可能不仅仅在于补充组织细胞，而且还可能具有防止体细胞自发突变的作用。过渡细胞的分裂速度很快，其基因组的突变频率就高，但其细胞的寿命相对很短，故不会形成突变的积累。

2. 干细胞增殖系统具有很强的自稳定性　自稳定性（self-maintenance）是指干细胞可以在生物个体生命期间内自我更新（self-renewing）并维持其自身数目恒定的特性，它是干细胞的基本特征之一。当干细胞发生分裂后，如果所产生的两个子代细胞都是干细胞或都是分化细胞，这种分裂方式称为对称分裂（symmetry division）；如果产生一个干细胞和一个分化细胞，则称之为不对称分裂（asymmetry division）（图 17-1）。

对无脊椎动物而言，不对称分裂是干细胞维持自身数目恒定的基本方式。例如，在果蝇的外周神经组织中，其感觉器官的前体细胞的不对称分裂是受一系列基因调控的，*insc* 基因就是其中的一个。该基因的表达产物（即 Insc 蛋白）至少在三个方面对不对称分裂进行调控：①不对称地分配细胞膜上的膜联细胞命运因子（membrane-associated cell fate determinant），如 Numb；②不对称地分配细胞内 mRNA；③决定细胞分裂时纺锤体的取向。但对哺乳动物而言，却并非如此简单，在大多数哺乳动物的可自我更新的组织中，干细胞分裂产生的两个子细胞既可能是两个干细胞，也可能是两个特定分化细胞，因此哺乳动物的单个干细胞通常是进行对称分裂。但平均而言，每一个干细胞可以产生一个子代干细胞和一个特定分化细胞。因此，哺乳动物的干细胞是种群（而不是单个干细胞）意义上的不对称分裂（populational asymmetry division）（图 17-1B）。干细胞不对称分裂机制的存在，使得机体对干细胞的调控更具灵活性，可以更灵活的应对机体生理变化的需要。为了保持干细胞数目的恒定，机体需要对干细胞的分裂进行十分精密的调控。有研究表明，在小肠隐窝（crypt）中，如果额外多产生一个干细胞，则该干细胞进而就会多产生 64~128 个子代细胞，而每个正常隐窝仅由大约 250 个细胞组成。由此可见，维持干细胞数目的恒定有保持组织的稳定和功能的重要性。然而，目前对于哺乳动物干细胞不对称分裂的调控机制及其细节知道甚少。



●图 17-1　干细胞的不对称分裂

A. 干细胞的简单不对称分裂　B. 干细胞的种群不对称分裂

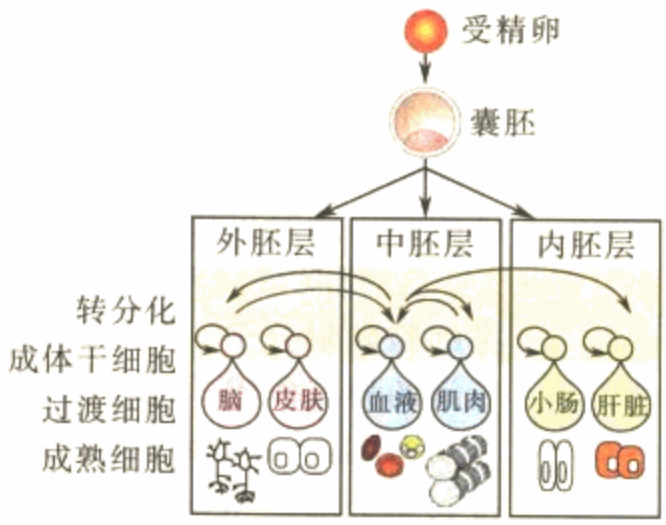
高度进化的哺乳动物，对其干细胞的调控是多角度多层次的。其中，细胞凋亡也是调节干细胞数目的一个重要因素。有人发现，通过转基因技术使小鼠的造血干细胞高表达抗凋亡蛋白 Bcl-2 后，可使其造血干细胞的数目显著增加。另外，也有人认为干细胞的自稳定性是其区别于肿瘤细胞的本质特征。

四、干细胞的分化特性

1. 干细胞具有产生一种以上特定功能细胞的分化潜能　具有分化产生特定功能细胞的能力是干细胞的另一个本质特征。如上所述，处于不同发育阶段的干细胞的分化潜能也不

相同。受精卵被认为是全能性的干细胞，因为它可以形成一个完整的个体。囊胚中的内细胞团细胞，具有产生个体中任何一种组织细胞的潜能，但不能产生胎盘和其他一些发育时所必须的支持组织，所以，这种细胞是多能性干细胞。而成体干细胞的分化潜能进一步受到限制，通常只能分化产生与之相关的特定功能的细胞。如小肠干细胞可分化产生小肠的吸收细胞、杯细胞、嗜酸细胞和肠内分泌细胞。一直以来，成体干细胞被认为只能向一种类型或与之密切相关的细胞分化，如神经干细胞只能向神经系统细胞（神经元和神经胶质细胞）分化，而不能分化成其他类型的细胞。但是，近年的一些发现则对这一观点提出了挑战。越来越多的证据表明，分离自成体的干细胞仍然具有相当的可塑性，在适当的条件下可以表现出更广泛的分化能力，甚至实现跨胚层的分化。这从根本上打破了传统的胚层限制的观点。

2. 干细胞的分化具有一定的可塑性　干细胞分化的可塑性，是指干细胞在适当的条件下，可以发生转分化（transdifferentiation）或去分化（dedifferentiation）的现象（图 17-2）。一种组织类型中的干细胞，在特定的条件下分化为另一种组织类型的细胞的现象，称为干细胞的转分化。1997 年，M.A.Eglitis 等人将从成年雄性 C57BL/6j 小鼠中分离的造血干细胞移植到受亚致死量照射的雌性 WBB6F1/J-kit^{W}/kit$^{W\text{-}V}$ 小鼠体内，三天后在受体雌鼠的胶质细胞中检测到 Y 染色体的存在，这暗示了成年动物的造血干细胞可分化成为脑组织中的胶质细胞。随后，类似的发现还包括成体造血干细胞分化形成肌细胞和肝细胞，以及神经干细胞转分化为造血细胞，等等。由于转分化现象对人们传统的细胞分化观念的冲击，以及细胞转分化能力在疾病治疗方面的潜在应用价值，细胞转分化的研究已成为干细胞研究领域的热点。



●图 17-2　干细胞的可塑性

干细胞向其前体细胞逆向转化的现象被称为去分化。长期以来，对自然情况下的细胞是否可以逆向分化的问题一直存在争议，而对于干细胞去分化的证据则也就更少了。但有实验表明，当把来自成体鼠的造血干细胞注入鼠卵泡的内细胞团后，成体鼠造血干细胞的分化状态可以发生逆转，开始表达胎儿的珠蛋白基因，并参与胚胎造血系统的发育。这一结果，在一定程度上暗示了去分化现象存在的可能性。

尽管干细胞的转分化和去分化的细节还需进一步的认识，但就已有的现象来看，其生物学意义和医学意义是值得关注的。

五、干细胞生理活动的微环境

干细胞的生理活动主要包括其增殖与分化。增殖与分化是调控组织中干细胞群体稳定性的基本方式，也是调控组织器官结构和功能动态平衡的基本方式。目前一般认为，干细胞的增殖与分化存在一个严密的调控机制，这个调控机制可能就与它所在的组织中的微环境有关，这种微环境被称为“干细胞巢” (stem cell niche)。目前已经知道，不同干细胞巢的结构和组成存在很大的差别，这也许就是不同干细胞的生物学行为都受到特定机制调控的结构基础。当然，干细胞巢也有一个基本的特征，即在结构上是一个由干细胞及其外围细胞、以及参与其增殖分化调控的相关因子所组成的，并具有动态平衡特性的局部环境。目前一般认为，在干细胞巢结构体系中参与干细胞增殖分化调控的相关因素主要有以下三个方面。

1. 干细胞巢中的分泌因子是干细胞增殖分化的调控因子　在干细胞巢中，分泌因子（secreted factors）可以是干细胞自身分泌的，也可以来自外围细胞或者其他组织细胞。它

们对于干细胞增殖与分化的调控具有重要作用。在不同的干细胞微环境中，以及不同的生理或发育状态下，分泌因子的种类及其水平可有很大差别，但它们总是与机体发育或生理状态的需求相适应的。目前发现，TGF-β 和 Wnt 家族的信号分子在多种干细胞的不对称分裂以及维持干细胞自我更新方面起重要作用。如 Wnt 信号分子，可以通过由 β-catenin 和 Tcf/Lef 家族蛋白参与的信号通路激活转录。目前已经证实，该信号通路对于表皮和肠上皮的形成有重要作用。有研究显示，Tcf4 纯合缺失小鼠缺乏肠干细胞，Lef1 纯合突变小鼠的毛发发育不正常，TGF-β 家族成员 Dpp 对维持果蝇雌性生殖干细胞的增殖是必不可少的。这些结果从不同的侧面反映了干细胞巢中分泌因子的重要性。

2. 细胞间直接相互作用也是干细胞增殖分化的一种调控因素　在干细胞巢中，除游离的分泌因子可以对干细胞发挥作用外，有些调控干细胞命运的信号分子则是通过细胞与细胞之间的直接接触而发挥作用的。这种相互作用通常是由整合膜蛋白（integral membrane protein）所介导的。整合膜蛋白为跨膜蛋白（transmembrane protein），是两性分子，其疏水部分位于脂双层内部，亲水部分位于脂双层外部。由于存在疏水结构域，整合膜蛋白与膜的结合非常紧密。在相互作用的两个细胞中，一个细胞中跨膜蛋白的胞外段作为配体，另一个细胞的跨膜蛋白的胞外段则作为受体。许多介导细胞与细胞黏附的受体分子都是整合膜蛋白，但是这种细胞间黏附对干细胞的调节作用目前认识不多。现已知 Notch 介导的细胞间作用对果蝇感受器官的正常发育必不可少。

3. 整联蛋白和胞外基质参与干细胞巢的结构体系的形成　整联蛋白（integrin）是一类细胞黏附分子，其作用依赖于 Ca^{2+}，介导细胞与细胞间的相互作用以及细胞与细胞外基质间的相互作用。现在已经知道，几乎所有动植物细胞均表达整联蛋白。其中细胞与胞外基质的附着可以由多种受体介导，但目前认识最多的是整联蛋白。高表达 β-integrin 对维持表皮干细胞（epidermal stem cell）的增殖分化至关重要。β-integrin 还通过 MAP 激酶途径调节角质化细胞等细胞的分化。此外，整联蛋白有维系干细胞在组织中正确位置的作用，否则干细胞会脱离生存环境而分化或凋亡。胞外基质还有调节干细胞微环境中局部分泌因子浓度的作用，整联蛋白的激活和表达也要受胞外基质蛋白的调节。

有关干细胞巢在维护干细胞自我更新，以及其分化命运的决定等方面的生物学意义，在高等脊椎动物中已有越来越多的认识。例如，将小鼠的内胚层细胞置于另一只小鼠胰芽的分散细胞中，内胚层细胞可转变为胰腺细胞的前体细胞，这就显示了干细胞生存的微环境对其命运决定的重要性。

目前，干细胞生物学所面对的一个主要挑战，就是确定干细胞巢中决定干细胞各种生物学行为的关键作用因子。现在已经知道，在某些组织的干细胞巢中，其干细胞的类型不止一种。例如在骨髓干细胞巢中不仅有造血干细胞，还有间充质干细胞。这就意味着，不同的干细胞可以对同一个干细胞巢中的作用因子做出不同的反应。由此可见，认识干细胞微环境中的各种作用因子，是一个相当复杂的问题。

第二节　胚胎干细胞

胚胎干细胞是存在于早期胚胎组织中，具有多向分化潜能的细胞，它可以分化为胎儿或成体组织中的各种细胞类型。目前已经知道，胚胎干细胞可以在体外无限扩增，并可以进行传代、遗传操作和冻存，也可以在体外条件下将其诱导分化为多种细胞或组织，而且还可将其与受体胚胎嵌合，形成嵌合体（可嵌合进入包括生殖腺在内的各种组织）。因此，胚胎干细胞在哺乳动物早期胚胎发育、细胞分化、基因表达调控等发育生物学问题的研究方面具有特殊的生物学意义和实用价值。

一、胚胎干细胞存在的位置

胚胎干细胞通常是指存在于囊胚期胚胎中的内细胞团细胞。从个体发育的角度来看，这种细胞具有分化为一个个体中的任何细胞类型的潜能。这就是说，这种细胞是个体发育的起始细胞。在体外实验中，也已证明这种细胞确实具有多向分化潜能。M.J.Evens 和 M.H.Kaufman 于 1981 年首次分离培养了小鼠的胚胎干细胞（当时曾称其为 EK 细胞），随后，A.Bradley 和 A.Nagy 等证明了这种细胞在被导入囊胚后可以分化为包括生殖细胞在内的多种组织的细胞。后来，研究者们成功地分离了猪、牛、绵羊、仓鼠、鸡、斑马鱼及恒河猴等脊椎动物的胚胎干细胞。特别值得关注的是，美国威斯康辛大学 J.A.Thomson 实验室于 1998 年从体外受精所形成的囊胚的内细胞团中成功分离培养了人的胚胎干细胞。对人胚胎干细胞分化特性的研究，让人们看到了胚胎干细胞研究的医学意义。

在囊胚后续的发育过程中，有些类型的细胞在特定的条件下也可表现出类似于囊胚内细胞团中干细胞的基本特性，即自我更新能力和多向分化潜能等。例如，在胚胎生殖嵴（gonadal ridge）中就含有这种多向分化潜能的细胞，目前习惯上称其为胚胎生殖细胞（embryonic germ cell，EG 细胞）。美国约翰霍普金斯大学 J.D.Gearhart 实验室于 1998 年从 5~9 周龄的流产胎儿的生殖嵴中分离培养了这种细胞，并在体外证明了它的基本生物学特性与来自于内细胞团的干细胞的生物学特性十分相似。又如，小鼠的卵黄囊（胚外内胚层）细胞在一定的诱导条件下也可以表现出多向分化潜能。

经典实验：小鼠胚胎干细胞的分离培养

背景知识

早期胚胎细胞具有独特的增殖和分化的能力，它可以分化为身体的各种细胞，并形成相应的组织和器官。早在 1970 年，就有人发现小鼠的早期胚胎细胞从子宫移植到其他部位后有易发畸胎瘤（teratocarcinoma）的现象。而且发现，畸胎瘤细胞可在体外培养，并可分化为许多不同类型的细胞。进而也发现，如果采用显微注射的方法将它们移植到小鼠的囊胚内，它们还可以参与其胚胎小鼠的个体发育。这些结果，暗示了畸胎瘤细胞可能具有正常胚胎干细胞特性的可能性，但并没有涉及到畸胎瘤发生的原理。Gail R.Martin 曾假设在畸胎瘤中的畸胎瘤细胞可能是正常的胚胎细胞，而它们在异常部位易发畸胎瘤的现象，可能是因为它们在异常的部位得不到本来在子宫中应有信号的诱导的结果。基于这一假说，她培养了小鼠的胚胎细胞，而且得到正常的小鼠胚胎干细胞系。她的研究与当时 Martin Evans 和 Matthew Kaufman 的类似研究都为小鼠的遗传操作和发育分析，以及后来的人胚胎干细胞的研究奠定了基础。

实验内容

根据畸胎瘤细胞是起源于正常胚胎干细胞的假设，Gail R.Martin 从小鼠囊胚中培养胚胎干细胞。她最初从大约 30 个胚胎中分离到了 4 个克隆，证明了它们可以在体外连续地传代。而且发现，这些细胞系（即胚胎干细胞系）与畸胎瘤的畸胎瘤细胞很相似。当然，最重要的是这些胚胎干细胞在体外培养的条件下能被诱导分化为各种类型的细胞，其中包括：内胚层细胞、软骨细胞和神经样细胞。而且，若将这些胚胎干细胞移植到小鼠体内，它们还可以形成含有多种分化细胞类型的肿瘤。这些结果表明了采用体外培养的方法，可以从正常的小鼠胚胎中建立具有多向分化潜能的胚胎干细胞系。

发表论文

Gail R.Martin （University of California，San Francisco，USA）：

Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma cells.Proc.Natl.Acad.Sci.USA，1981，78:7634-7638

Martin John Evans and Matthew H.Kaufman（University of Cambridge，UK）：

Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos.Nature，1981，292:154-156

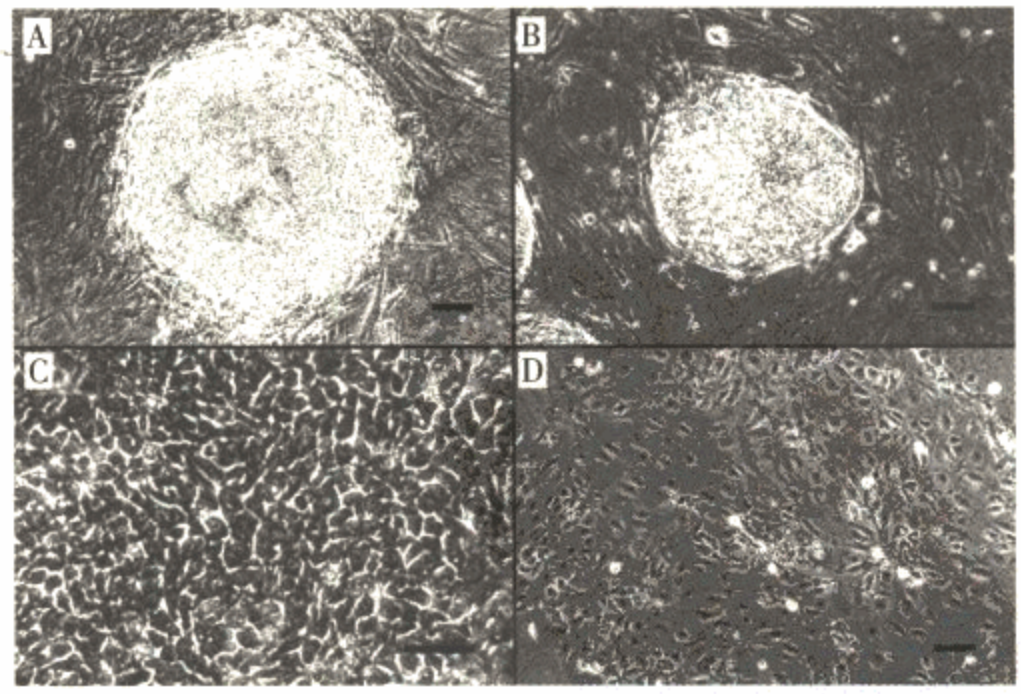
后续影响

小鼠胚胎干细胞系的建立，已经对小鼠遗传学和小鼠的生长发育，以及与人类健康相关的许多医学问题等方面的研究产生了重要的影响。后来的大量研究，也都证明了小鼠胚胎干细胞在被移植入小鼠囊胚后确实可以参与小鼠的正常发育。特别是基因转移、基因定点突变以及干细胞转化后的双向选择等技术体系在胚胎干细胞中的成功应用，使得基因工程小鼠（如基因剔除小鼠、基因替换小鼠以及大片段转基因小鼠等）的产生有了可能。基因工程小鼠的出现，为进行基因功能研究提供了一个完美的研究体系。当然，1998年建立的人胚胎干细胞系，对生物医药领域的影响也是巨大的，因为它的增殖和分化特性，为人类疾病治疗方法的发展带来了新的希望。

二、胚胎干细胞的生物学特性

胚胎干细胞是个体发育的起始细胞，从发育生物学角度讲，它的基本生物学特性就是能够有序的分化而成为三个胚层组织的前体细胞。然而，由于胚胎干细胞在体内自然情况下的数量较少、所存在的时间又较短，故目前对其生物学特性的真正认识主要是基于体外培养的胚胎干细胞的间接分析。

1. 胚胎干细胞具有原始细胞的形态和生化特征　胚胎干细胞的体积较小，核质比例较大，内质网及高尔基复合体等细胞器不发达。在囊胚中，它们以致密的集落样的形式（即内细胞团）生长，并附着于囊胚的内侧壁。在体外培养的条件下，胚胎干细胞的体积仍然很小，核质比例很大，核中可有多个核仁，它们也是以致密的集落样的形式生长，形似鸟巢（图17-3）。



●图 17-3　体外培养的人胚胎干细胞

A. 内细胞团细胞形成的原代克隆，标尺100μm　B. H9株人胚胎干细胞的克隆，标尺100μm　C. 放大的H9株人胚胎干细胞的克隆，标尺50μm　D. 发生分化的H9株人胚胎干细胞,标尺100μm

现在已经知道，各种哺乳动物的胚胎干细胞在体外培养条件下都具有相似的形态特征。

胚胎干细胞为未分化多能性细胞，它可表达早期胚胎细胞及畸胎瘤细胞（EC 细胞）的分子标记。但在不同的物种之间，其表面抗原的表达情况可有很大的差异，例如，小鼠的胚胎干细胞可以表达阶段特异性胚胎抗原-1 (SSEA-1)、不表达 SSEA-3 和 SSEA-4，但人的胚胎干细胞则不表达 SSEA-1，而表达 SSEA-3 和 SSEA-4。此外，存在于内细胞团发育阶段之后的早期胚胎中的具有多向分化潜能的 EG 细胞，其分子标志与胚胎干细胞也是不完全一致的。例如，人 EG 细胞可表达 SSEA-1，但人胚胎干细胞则不表达 SSEA-1。当然，从发育生物学的角度来看，处于不同发育阶段的细胞表达不同的分子标志的现象是完全可以理解的。

2. 胚胎干细胞具有向三个胚层组织细胞分化的潜能　在个体发育中，存在于囊胚内细胞团中的胚胎干细胞具有分化为后续发育个体的任何组织细胞的潜能。由于胚胎干细胞体外培养的成功，这一概念已经通过实验的方法得到了充分的证实。其大致的做法有三个方面：①将培养的胚胎干细胞在体外条件下进行诱导分化，然后观察其分化的情况。例如，将人胚胎干细胞在没有胎鼠成纤维细胞作为饲养层的条件下进行培养，其胚胎干细胞就会发生分化，而且在其培养液中还可以检测到 α-甲胎蛋白和人绒毛膜促性腺激素（hCG）的存在，这表明有向内胚层和滋养层方向分化的现象发生。又如，将胚胎生殖细胞置于白血病抑制因子存在的条件下，其中的部分细胞能分化成类胚体。在所形成的类胚体中，可以发现有属于三个胚层的各种类型的分化细胞的存在，这就说明了胚胎生殖细胞具有多能性干细胞的特性；②将体外培养的胚胎干细胞移植到免疫缺陷型小鼠的皮下，然后观察是否可以形成混合组织瘤。例如，将人胚胎干细胞移植到重症联合免疫缺陷小鼠的皮下，其移植细胞就可以产生胚胎组织瘤，而且在其瘤组织中观察到了胃上皮（内胚层），骨和软骨组织、平滑肌和横纹肌（中胚层），神经表皮、神经节及复层鳞状上皮（外胚层）等细胞的存在，这就提示了人胚胎干细胞具有形成内、中、外三个胚层的潜能；③将体外培养的胚胎干细胞移植到小鼠囊胚腔中，观察其植入细胞是否可以分化为各组织细胞。1990 年，Nagy 等对小鼠胚胎干细胞的多向分化潜能的分析就采用了这种方法。他们通过显微注射的方法，将体外培养的小鼠胚胎干细胞植入小鼠的囊胚腔，使其参与内细胞团的继续发育，进而通过对所发育小鼠的各种组织的分析，证明了胚胎干细胞确实具有分化为包括生殖细胞在内的各种组织细胞的潜能。然而，由于伦理道德等方面的原因，这种方法不能用于人胚胎干细胞的分化评价。

三、胚胎干细胞的体外分化

现在已经知道，胚胎干细胞在体外培养的条件下可被诱导分化为各种类型的成熟体细胞。这一方面的进展，显示了胚胎干细胞在医学中应用的可能性。在实际研究中，目前的一般思路是先诱导胚胎干细胞形成类胚体（embroyoid body），然后再从类胚体中分离所需要的目标细胞，进而扩大培养和利用。

类胚体的制备可以采用悬滴培养的方式，将干细胞以较高的浓度移入含有甲基纤维素的悬挂的培养基液滴中，使其聚集生长增殖，由此便可形成具有三维特征的球状体。由于这种球状体与其被植入体内后的所形成的胚胎组织十分相似，故将其称之为类胚体。类胚体通常由具有三个胚层特性的衍生物所组成，可以认为是大多数成熟体细胞系的前体细胞。中胚层和外胚层的前体细胞在几天内便可形成，而一些内胚层的细胞类型则需要较长的时间，一般在 10 天以后。类胚体形成之后，便可将其调整为一般的正置状态进行培养，使其附着于培养皿的表面上生长。值得注意的是，由于类胚体缺乏极性，故不能发育成有形的胚胎。

在胚胎干细胞分化表型中，最为直观的是原始心肌细胞的表型出现。在经过几天悬滴培养后，就有可能在类胚体上观察到个别正在发生“波动”的区域。在随后的正置贴壁培

养中，可以看到大片状的、呈同步收缩的细胞。小鼠胚胎干细胞来源的心肌细胞可以表达一些组织特异性的标志，包括心脏的各种结构蛋白、受体和转录因子。在具有收缩特性的细胞群中，反映心脏不同特殊功能的细胞可以用电生理方法检测出来，包括心房样细胞，心室样细胞，浦肯野细胞样细胞和结细胞样细胞。研究发现，将胚胎干细胞来源的心肌细胞植入小鼠体内之后，这些胚胎干细胞来源的心肌细胞能够整合入小鼠心脏组织中，并参与血管形成，而且还能在所植入的位置上继续增殖与分化。为了生产用于组织工程的心肌细胞，人们正致力于研究扩增分化的技术，以及从已分化的细胞群中选取合适细胞类型的策略。目前，已经可以基于鼠胚胎干细胞诱导分化的方案，从人类胚胎干细胞中产生心肌细胞，这无疑为再生医学中的心脏组织工程提供了一个全新的思路。但是，也存在一些问题。例如，除了组织免疫相容性的问题之外，胚胎干细胞来源的心肌细胞的分化状态也正在得到关注，这些在体外状态下所得到的分化细胞更多地表现为胎儿心肌细胞的特征，而没有成人心肌细胞的基本表型。也有研究发现，植入的具有自主跳动特性的心肌细胞还可能会引发严重的心律失常，这些细胞一旦整合入内源性的心脏组织中，这种心律失常则很难加以纠正。因此，胚胎干细胞的治疗在从实验室研究到临床应用之前，还有许多问题需要解决，其中最为重要的一点就是要证实，由胚胎干细胞分化产生的各种类型的分化细胞是否具有与宿主组织之间发生完全的功能性整合的能力。

除了心肌细胞，一些其他类型的体细胞，也有可能通过小鼠和人胚胎干细胞得到，如属于中胚层的软骨细胞、脂细胞和内皮细胞等。A.E.Bishop 实验室 (2004) 建立了一套成骨细胞分化的体系，他们将小鼠类胚体分散为单细胞状态，并将其置入一种专门的培养基中培养，便可得到较高比例的成骨细胞。而且发现，在培养 14 天后再添加一定浓度的地塞米松，由此便可将分化的比例进一步扩增 7 倍。这表明，对于细胞的分化，合适的胞外刺激因子本身是非常重要的，其添加的时间也同样是非常重要的。现在，用同样的方案已经可以从人类胚胎干细胞中得到大量的成骨细胞。

小鼠胚胎干细胞向神经外胚层的分化相对容易，目前已有几种不同的方案来得到大量的神经元样、星形胶质细胞样或少突胶质细胞样细胞。这些方案可以不必经过类胚体的步骤，而是直接通过胚胎干细胞的单细胞层培养的方式，使其分化为神经外胚层细胞。有研究表明，这些分化细胞被植入小鼠模型后，仍然具有功能活性（即可以形成突触并产生动作电位），而且能够整合入大脑，并可纠正某些神经变性疾病的表型。

关于胚胎干细胞向肺泡上皮细胞的分化，目前也有一些工作。有研究表明，相对于中胚层和外胚层的细胞类型来说，内胚层细胞实际上是难以得到的。有人曾用成骨细胞分化的类似方法，并应用一种叫做 SAGM（small airway growth medium）的特殊培养基（可以在培养时维持末梢肺泡上皮细胞的生长），从诱导分化的鼠胚胎干细胞的培养物中富集到了肺泡 II 型上皮细胞。然而，尽管有了细胞富集的步骤，但这些细胞的出现率还是很低的。其他一些可以从胚胎干细胞中得到的内胚层细胞类型有肝细胞和胰岛细胞。但在目前，从胚胎干细胞中诱导获得内胚层细胞系的过程还远远滞后于另外两个胚层。

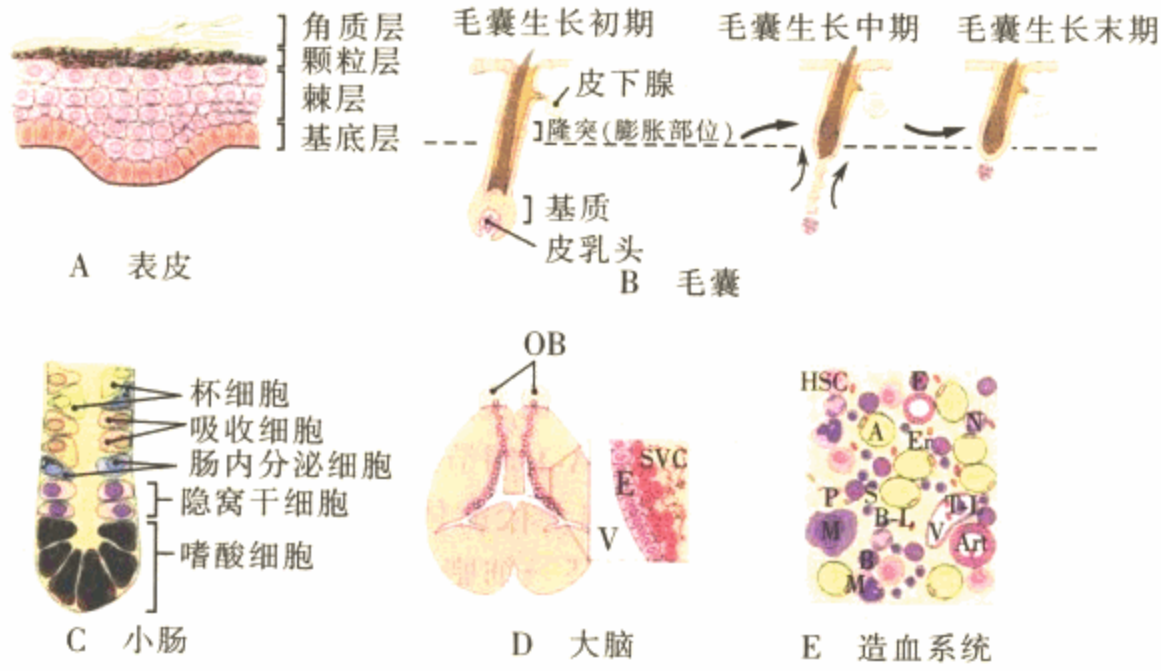
尽管目前在实验室里确实可以将胚胎干细胞诱导分化为许多类型的具有相应表型的细胞，但在其分化的效率、成熟的程度、分离的纯度，以及在活体中是否具有真正的功能等方面则仍然还有许多问题需要解决。

第三节　成体干细胞

在成体组织或器官中，有些细胞仍具有自我更新及分化产生不同组织细胞的能力，如骨髓和皮肤中的细胞；此外在损伤情况下，肝等组织也表现出明确的补充受损死亡细胞的

能力，所以一直推测在成体中也存在一些能起新旧更替作用的成体干细胞。

造血干细胞是最先被认识的成体干细胞。近年来，由于细胞生物学和分子生物学的发展，除造血干细胞之外已有多种其他成体组织的干细胞被成功分离或鉴定（图 17-4），如间充质干细胞、神经干细胞、皮肤干细胞、肠干细胞及肝干细胞等。目前普遍认为成体干细胞是在成体组织内具有自我更新能力及能分化产生一种或一种以上子代组织细胞的未成熟细胞。本节主要从成体干细胞的形态、生化特性、生存的微环境等角度来介绍目前认识较为明确的几种成体干细胞。



●图 17-4 成体干细胞示意图

A. 表皮组织，干细胞位于基底层 B. 毛囊，干细胞位于膨胀部位 C.小肠隐窝干细胞 D.大脑，干细胞位于室管膜或下脑室区（V.脑室区；SVC.下脑室区；E.室管膜；OB.嗅觉球） E. 造血系统（HSC.造血干细胞；A.脂肪细胞；M.巨噬细胞；T-L. T淋巴细胞；B-L. B淋巴细胞；B. 嗜碱性粒细胞；E. 嗜酸性粒细胞；N. 中性粒细胞；Er. 红细胞；P.血小板；S.基质细胞；V. 静脉；Art.动脉）

一、造血干细胞

1961 年 Till 和 McCulloch 首次通过小鼠脾集落形成实验证实了**造血干细胞**（hematopoiesis stem cell，HSC）在成体内的存在，这也是第一种被认识的组织特异性干细胞。目前，主要通过表面标志来分离纯化 HSCs，已比较明确的人造血干细胞的表面标志包括 $CD34^+$、$CD38^-$、Lin^-、HLA^-、DR^-、Thy^+、$c\text{-}Kit^+$、$CD45RA^-$和 $CD71^-$等。其中，CD34 是临床上应用最多的造血干细胞标志物。人出生后造血组织中有 0.1%~0.5%的 $CD34^+$细胞表达 KDR，即血管内皮生长因子受体 2（VEGFR2）。1999 年，J.Ziegler 等用分别来源于骨髓、外周血、脐带血的 $CD34^+$、$CD34^+KDR^+$和 $CD34^+KDR^-$细胞植入经致死剂量照射的小鼠，发现 $CD34^+KDR^+$细胞均能成功植入，而 $CD34^+KDR^-$细胞不能植入（受体鼠死亡）。随后一系列的相关移植实验显示：造血干细胞存在于 $CD34^+KDR^+$亚群，而造血祖细胞存在于 $CD34^+KDR^-$亚群，分化程度介于这两者之间的祖细胞则同时存在于这两种亚群中，因而 KDR 可将干/祖细胞区别开来。

在哺乳动物发育过程中，血细胞首先出现在胚外中胚层——卵黄囊，被称为胚胎有核红细胞。这些血细胞表达与它们造血命运相关的特定转录因子，随着胚胎发育，这些中胚层衍生而来的前体细胞迁移进入造血环境：主动脉-性腺-中肾区（Aorta-gonad-mesonephros，AGM）。血管内皮生长因子（VEGF）及其酪氨酸激酶受体（Flk）的信号传导途径对胚胎

血细胞和内皮前体细胞迁移进入 AGM 是必不可少的。随着发育进程，造血干细胞进一步迁移至胎肝和脾脏，此过程依赖 β1 整联蛋白。造血干细胞表面的整联蛋白能与环境信号作用，从而控制内源因子的表达。当在胎肝滞留时，一些造血干细胞可以分化产生功能定向的前体细胞，这些前体细胞可产生髓系和淋巴系细胞。在出生前，造血干细胞又移位至骨髓并在那里保留至整个生命过程。

骨髓微环境中的一些转录因子和蛋白分子对造血干细胞的移行、增殖和分化起了调控作用。如可溶性和膜包被的干细胞因子（stem cell factor，SCF），不仅可与干细胞表面的 c-kit 受体作用，对干细胞的黏附也是极为重要的，造血系统的细胞虽然与其他黏附性组织（固态性）细胞在外观上相当不一致，但造血干细胞还是与它们生存的微环境有着极密切的关系。SCF 还参与维持干细胞数目的恒定。虽然 SCF 或 c-kit 的遗传缺失不影响原始造血发生，但它们能引起严重的造血调控失调（在胎肝期以后）。另外也发现 FGF-1 (fibroblast growth factor 1)、FGF-2、SDF-1（α-chemokine stromal cell derived factors-1）和胞外基质都能与造血干细胞表面的相关受体起作用而影响造血干细胞的移行，数目维持和分化。在所有干细胞系统中，造血干细胞增殖与分化的分子途径了解的最为清楚，许多参与造血干细胞增殖与分化的细胞因子、转录调节子已被鉴定。如转录因子 GATA-2 对造血前体细胞的增殖和存活是关键的，而转录因子 GATA-1 调节红系、巨核细胞等的存活、增殖和成熟，转录因子 PU1 的表达可促使造血干细胞子代前体细胞进一步分化产生淋巴系和髓系细胞，等等。但转基因的研究显示这些决定某一细胞系的命运的转录因子似乎并不是特异性的，造血干细胞可互表达多种所谓的细胞系限制因子，所以目前对各种血细胞系的发生及形成应考虑有更复杂性的机制存在。

二、间充质干细胞

间充质干细胞（mesenchymal stem cell，MSC）形成于个体发育中的骨髓腔（marrow cavity）。当成骨细胞形成原始的骨领被破骨细胞侵蚀时，血管可以进入骨领形成骨髓腔。血管的侵入带来了原本在骨膜中的成骨细胞，它们进入骨髓腔后成为血管外围细胞，进而发育成骨髓窦，由此形成可使造血干细胞存活的血管外环境。造血干细胞迁入后与原始基质相互作用，便可建立造血功能。与此同时，原始的间充质干细胞也可中止成骨分化。个体出生后，间充质干细胞附于骨髓窦的内腔面，形成一种包埋于窦状网络中的三维细胞网络。间充质干细胞在原始不具造血功能的骨髓中，分裂旺盛，类似前成骨细胞 (pre-osteoblast)。在具造血功能的骨髓中，间充质干细胞是静止的，但是仍然高水平表达成骨细胞的特征性标记碱性磷酸酯酶。骨髓腔和骨髓基质的形成需要关键性的转录因子 cbfa1，cbfa1 在控制成骨细胞的分化和促进骨形成的过程中起重要作用。

人的间充质干细胞属于专能性干细胞，存在于成人骨髓中，可以像未分化细胞那样进行体外扩增，也可以分化为间充质细胞。对骨髓抽提物采用密度梯度离心的分离方法，分出处于 1.073g/ml 密度界面上的细胞（占细胞总数的 0.01%~0.1%），进行平皿接种，细胞贴壁生长，类似成纤维样细胞。通过换培养基的方式除去悬浮生长细胞（如造血干细胞），可获得纯度达 95%~98%的间充质干细胞。间充质干细胞的特异性表面抗原有：SH2、SH3、CD29、CD44、CD71、CD90、CD106、CD120a 及 CD124 等。与造血干细胞不同，间充质干细胞不表达 CD45、CD34、CD41、CD14 等表面抗原。分离获得的间充质干细胞在体外成单层生长，并有稳定核型。

间充质干细胞可分化为多种间充质组织，如骨、关节、脂肪、肌腱、肌肉、骨髓基质等。从人骨髓中获得的间充质干细胞体外可专一性的诱导分化为脂肪细胞，软骨细胞和成

骨细胞。在含有 1-甲基-3-异丁基黄嘌呤、地塞米松、吲哚美辛的培养基中培养时，95%的间充质干细胞会分化为胞内富含脂滴的细胞，并表达过氧化物酶体增殖激活受体 λ2 (peroxisome proliferation-activated receptorλ2，PPAR λ2)，脂蛋白脂肪酶 (LPL) 和脂肪酸结合蛋白 (ap2) 等脂肪细胞特异标志。MSCs 在含转化生长因子 β3 (transforming growth factor β3，TGFβ3) 的无血清培养基中生长，10~14 天后，用 c4f6 单抗检测发现有Ⅱ型胶原蛋白表达，并且在 10~21 天内，表达量逐渐上升，这表明已被诱导为软骨细胞。在含地塞米松，β-磷酸甘油，维生素 C 和含有 10% FBS 的培养基中培养时，间充质干细胞开始聚集，碱性磷酸酯酶的活性会增高 4~10 倍，一周后细胞内钙的积累持续增加，这表明已被诱导为成骨细胞。由单个间充质干细胞扩增获得的克隆有与之相同的分化潜能。

由于间充质干细胞可以在体外相对容易的诱导分化为成骨细胞和软骨细胞，间充质干细胞在骨损伤，先天骨组织畸形的治疗方面将有广泛的应用。

三、神经干细胞

传统观点认为，中枢神经系统的神经元在出生后不久就丧失其再生能力，成人脑细胞一经损伤就不能再生。然而近来的一些研究证明，在中枢神经系统中部分细胞仍具有自我更新及分化产生成熟脑细胞的能力，这些细胞被称为神经干细胞 (neural stem cells，NSC)。

哺乳动物的脑由包括一个充满脑液的脑室管状结构发育而来。由神经嵴 (neural crest) 衍生的细胞最初位于腔面细胞层或脑室区，随着发育的进行进入下脑室区 (subventricular zone)。这些细胞进而在嗅球 (olfactory bulb) 部位形成星形细胞、少突胶质细胞和神经元。1992 年 B.A.Reynolds 和 S.Weiss 首先在成体小鼠的脑旁侧室膜下的神经组织中分离和培养了神经干细胞。1999 年，C.N.Svendsen 等用相同的方法从人的胚胎中分离出神经干细胞。神经干细胞在 EGF 的作用下不断分裂，如果每周传代一次，可以维持一年以上。目前人们将神经干细胞表达的一种中间丝 nestin 作为神经干细胞的特征性生物学标记。Nestin 属于第Ⅳ类中间丝，它的表达起始于神经胚形成时。当神经细胞的迁移基本完成后 nestin 的表达量开始下降，并随神经细胞分化的完成而停止表达。免疫组化证实所有神经干细胞 nestin 均呈阳性。在神经干细胞培养过程中，如果以小牛血清代替 EGF，神经干细胞可进一步分化为星形胶质细胞，少突胶质细胞和神经元，nestin 的表达逐渐减少，而出现神经元特征性的微管相关蛋白-2 (microtubule-associated protein，MAP-2) 及胶质细胞的特征性神经胶质原纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein，GFAP)。表皮生长因子并不是维持神经干细胞的惟一因子，碱性成纤维生长因子 (FGF-2) 能直接刺激神经干细胞的增殖与分化。例如，来自睫状缘色素细胞的视网膜干细胞在体外可以克隆化增殖并形成球形集落。集落中包括视杆细胞、双极神经元、Müller 神经胶质细胞，视网膜干细胞可以在无外源生长因子的存在下连续传代并维持克隆化生长，但是如果在培养基中加入 FGF-2 的抗体，则生长能力显著下降。这表明 FGF-2 是通过自分泌的方式调控视网膜干细胞的增殖。M.Raff 等人报道向一种被称为少突胶质-2 型星形胶质前体细胞 (oligodendrocyte-type 2 astrocyte progenitor cells，O-2A) 的培养基中加入 FGF-2 后，通常分裂缓慢的 O-2A 开始快速增殖并产生大量的细胞。而血小板源生长因子 (platelet-derived growth factor，PDGF) 和睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor，CNTF) 都能影响 O-2A 的分化。神经干细胞的分裂方式既有不对称分裂，也有对称分裂。在对称分裂条件下产生的两个子代细胞可均是干细胞，也可以是两个祖细胞。在不对称分裂条件下产生一个干细胞一个祖细胞。

EGF、FGF-2 的受体及 nestin 分子可以作为寻找神经干细胞的标志分子。神经干细胞可以从中枢神经的嗅球、海马、下脑室、脑干、大脑等部位获得，也可以从外周神经系统

如脊髓、感觉器官（嗅觉上皮和视网膜）等部位获得。但是来源于不同部位的神经干细胞存在一定的差异，如来自前脑的神经干细胞比较容易被诱导成 γ-GABA 能神经元，而来在脊髓的神经干细胞比较容易被诱导成运动能神经元。

四、皮肤干细胞

与造血系统一样，在整个生命过程中，表皮细胞和毛囊也不断进行着再生，另外机体体表的不断扩增也需表皮细胞和毛囊不断的增殖。而表皮中确实含一层可以不断分裂的基底细胞，此层细胞能周期性的进入分化程序，外推至皮肤表面以取代脱落的角质细胞。这层基底细胞就是表皮的干细胞。由于表皮细胞的快速更新，所以表皮干细胞具有强大的增殖能力。

除了在表皮的基底细胞中存在干细胞外，毛囊部位也有干细胞的存在。毛囊由外根鞘、内根鞘和发干组成。产生内根鞘和发干的活跃分裂细胞称为基质细胞，基质细胞是存在于毛囊球中的一群可分裂的上皮细胞，毛囊球中还包括一团特化的间充质细胞称为真皮乳头。在成体毛囊中，当基质细胞耗尽其增殖潜能后，毛囊退化，并拉动真皮乳头细胞团到毛囊的膨胀部位，此膨胀部位实际上是毛囊干细胞存在的部位。受到来自真皮乳头细胞信号刺激后，在膨胀部位的干细胞增殖产生新的毛囊。这些干细胞同样可以产生表皮，尤其在外伤或烧伤后能重建表皮及毛发。脉冲标记试验表明膨胀部位的细胞有较长的细胞周期。体外培养膨胀部位细胞可以很好的长出毛囊角质细胞，当膨胀部位细胞与皮乳头细胞混合培养时可形成能存活的毛囊。

角化细胞的一个最具特征性的生化标志是 K5 和 K14 分子，它们产生的角蛋白在成熟皮肤细胞中形成中间纤维网络。膨胀部位的表皮干细胞也有 K5 和 K14 角蛋白及中间纤维网络的存在，这些角蛋白在基底上皮和外根鞘细胞中甚至存在更广泛。有实验表明，一个人毛囊干细胞在适当的培养条件下，能产生多达 1.7×10^{38} 个子代细胞，大大超过了完全覆盖成体体表面积所需的细胞数量。通过对这些具有高增殖潜能的角质细胞的进一步研究，更多的特异性生化标志被鉴定出来。通过免疫荧光观察发现这些细胞有低水平的细胞间连接蛋白——钙粘连蛋白 (E-cadherin) 的表达。这表明体内产生角化细胞的干细胞能与富含胞外基质的基底膜细胞强烈黏附，这有可能是维持它们在巢中的一个机制，而这种黏附能力的下降则可能是干细胞迁移和从巢中脱离向表皮分化的原因。在角化细胞表面的整联蛋白和黏附素不仅在细胞黏附上起了很大的作用，而且可能也在维持它们增殖和存活的信号传导途径中发挥重要的作用。

近来的研究发现，Wnt 及其相关信号也参与表皮干细胞的分化调节。β-catenin 在正常状况下与 E-cadherin 相互作用而促进细胞的黏附。当 β-catenin 的快速更新被 Wnt 信号阻断时，过量的 β-catenin 可与 Lef/Tcf DNA 结合蛋白家族成员结合，形成的复合物可激活下游基因的转录，包括 *c-myc* 和细胞周期蛋白 D1。因此，β-catenin 是弱化干细胞在巢中附着，并激活干细胞增殖分化的关键因子。然而，这一过程的精确分子机制和外源信号对这一过程的调节是相当复杂的，还有许多机制也是未知的。

五、肠干细胞

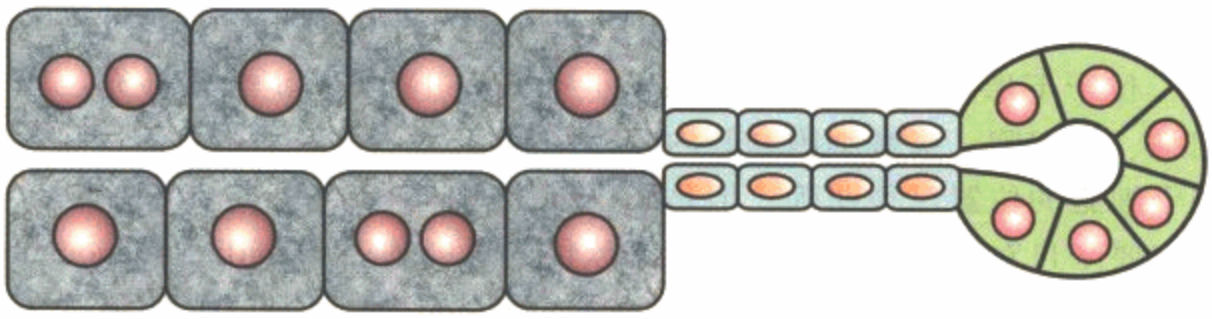
小肠黏膜表面有许多细小的肠绒毛，绒毛根部的上皮下陷至固有层形成肠隐窝（intestinal crypt）。每一隐窝大约有 250 个细胞，实验证明这些细胞中有起再生作用的干细胞存在。例如，把隐窝细胞注射到受照射的小鼠体内后，在受体鼠的小肠部位可发现由移植

细胞形成肠绒毛细胞。进一步的实验发现，这些细胞位于隐窝底层。当已分化的上层隐窝细胞死亡后，位于下层的肠干细胞（intestinal stem cell）可一步分化补充。肠干细胞可分化为吸收细胞、杯细胞、嗜酸细胞和肠内分泌细胞。

尽管肠干细胞的位置已很明确，但是肠干细胞的体外培养至今未获成功。目前对肠干细胞的认识主要来自对肠道肿瘤的研究。家族性肠息肉腺癌 (familial adenomatous polyposis coil) 是由于肠息肉腺癌基因 (adenomatous polyposis coil gene，*APC*) 缺陷所至。APC 可与 β-catenin 作用，并可加速其降解，这导致肠特异性 Lef/Tcf 家族成员 Tcf4 的发现。随后的功能研究表明，Tcf4 缺失小鼠隐窝干细胞发育有缺陷。隐窝干细胞也表达中间纤维 (IFs) 和上皮角蛋白 K8、K18 和 K19。K8 缺乏的小鼠可观察到大肠增生现象，这表明角蛋白表达水平的改变可影响肠干细胞的增殖和迁移功能。细胞间黏附也涉及对隐窝自身稳定的调控。E-cadherin 在小鼠肠细胞中高表达可抑制隐窝细胞的增殖并诱导凋亡。此外，整联蛋白及其 ECM 配体对隐窝干细胞数目的维持也十分重要。研究发现，参与肠干细胞和皮肤干细胞调控的机制有许多相似之处。但是，细胞凋亡对肠干细胞似乎有更为重要的调控作用。

六、肝干细胞

肝脏起源于前肠内胚层，与胚胎心脏相接触的前肠部分受到来自心脏间充质细胞分泌的 FGF 家族细胞因子的作用而形成肝脏的原基。如果阻断这些来自心脏的信号分子，本应该发育成肝脏的前肠部分将发育为胰腺。在肝的原基中，存在肝脏的前体细胞也被称为肝母细胞（hepatoblast），肝母细胞表达肝细胞特异性的蛋白如：甲胎蛋白和白蛋白。随着发育的进行，侵入间质组织的肝母细胞形成肝内胆管并开始表达胆管细胞特征性的分子标志：γ-谷氨酰转肽酶（γ-Glutamyl Transpeptidase，γ-GT）；在肝内胆管形成的初期，原始胆管细胞只表达细胞角蛋白 8 和 18；随着管样结构的形成，开始表达胆管特征性的细胞角蛋白 7 和 19，但是仍然有一部分细胞持续表达甲胎蛋白和白蛋白直至个体出生后。另一方面不与间质组织接触的肝索细胞分化为肝细胞并形成肝板；但是一部分肝细胞可持续表达γ-GT 直至个体出生；肝细胞中表达的中间纤维类型限于细胞角蛋白 8 和 18，而不会表达细胞角蛋白 7 和 19。因此肝索细胞是个体发育过程中的肝干细胞（liver stem cell），在不同的微环境中可向胆管细胞和肝细胞两个方向分化。但对于正常成体肝脏中是否存在肝干细胞却一直存在争论。肝脏是一个十分独特的器官，在正常情况下细胞的新旧更替十分缓慢。而且与造血、小肠和皮肤等器官不同，肝脏细胞的新旧更替是由成熟的肝细胞和胆管细胞的增殖实现的。成体肝脏细胞具有很强的增殖能力，尤其是成熟的肝细胞，这种增殖能力在肝脏 2/3 切除模型中得到直接体现。1931 年 G.M.Higgins 和 R.M.Anderson 建立了肝再生的经典实验模型：即通过简单的手术方式切除大鼠 2/3 的肝组织，大鼠的肝脏可进行再生并在两星期内恢复至原来大小。与肝脏生理性更新相同，2/3 肝切除后，剩余的肝细胞首先进入 DNA 合成，然后胆管上皮细胞、枯否氏细胞和肝脏星型细胞、窦内皮细胞依次进行 DNA 合成，最终通过这些细胞的分裂增殖实现肝脏的再生。目前还没有发现肝干细胞在 2/3 切除后的肝再生过程中起作用，也没有证据表明肝干细胞在肝脏的生理性更新中起作用。但是目前普遍倾向于接受肝干细胞存在的论断。在成体肝脏中，肝干细胞可能存在于 Hering 管位置：即终末胆管向细胞间胆管过渡的区域，或者组成 Hering 管的胆管细胞就是肝干细胞 (见图 17-5)。这些细胞通过不对称分裂一方面向胆管方向分化为胆管细胞，另一方面向中央静脉方向分化为肝细胞。有证据表明从门管区到中央静脉，肝细胞的分化程度由低到高。也就是说，从门管区到中央静脉存在肝细胞的分化梯度，这间接的支持了肝干细胞存在于 Hering 管的推断。如果肝干细胞的确存在于 Hering 管位置，则



●图 17-5　肝板模式图

肝干细胞被认为存在于Hering管位置

其在肝脏生理性更新中的作用还有待阐明。但是目前这种分化梯度的观点并没有得到普遍的接受，有人认为肝小叶中肝细胞的异质性仅仅是由于所处微环境的不同造成的。

但是，并不是所有肝再生过程都是由成熟肝细胞的增殖而实现的。当广泛而慢性的损伤导致大量肝细胞死亡或者肝细胞的增殖能力被抑制时（如化学毒物、病毒导致的肝损伤），在再生肝中可观察到所谓的胆管反应（ductular reaction）即在肝脏门管区出现一种小细胞，这种细胞因胞质少核呈卵圆形而被统称为卵圆细胞（oval cell）。目前，一般用卵圆细胞统指那些在严重损伤肝脏中产生的肝原始细胞。卵圆细胞的增殖和分化在肝脏损伤后的修复中起作用，具有肝干细胞的特征，具备分化为肝细胞和胆管上皮细胞的双向潜能。由于卵圆细胞不存在于正常肝脏中，因此对卵圆细胞的来源尚不明确。这类细胞很可能是由于正常肝脏中静止的肝干细胞被激活产生的。

确定干细胞微环境中的成分是相当困难的，这也是干细胞研究所面对的挑战。成体干细胞具有超出我们想象的分化可塑性，在不同的培养条件或微环境中，它们表现出更多样的发育潜能，这充分说明了干细胞微环境作用因子和作用机制的复杂性。但可喜的是，目前对干细胞作用因子的鉴定和作用机制的阐明步伐正在不断加快，而且不断有报道成体干细胞在体外成功建系。这必将加深我们对人体发育问题的认识，同时成体干细胞的研究成果也必将在医学领域产生深远影响。

第四节　特殊类型的干细胞

现在已经知道，机体中存在一些在生物学特性和功能明显不同于一般干细胞的成体干细胞。如精原干细胞能够产生具有减数分裂特性后裔细胞；癌干细胞出现于异常的个体等。尽管所谓“特殊类型干细胞”中“特殊”是人为的、相对的，而且目前知道的类型也有限，但这里还是将其单列，目的是希望增加对干细胞在个体生长发育与衰老过程中的复杂性的认识和理解。

一、精原干细胞

精原干细胞（spermatogonial stem cell）存在于睾丸曲细精管内，紧贴于曲细精管的基底膜。精原干细胞在曲细精管内的精原细胞（spermatogonium）中所占的比例很小，是分化程度最低的一类原始细胞，它是精子发生的细胞基础，对维持睾丸曲细精管结构和功能的稳定与平衡具有重要作用。精原干细胞是研究较早、较多的成体干细胞。早在 60 多年前，E.Rolshoven (1941) 关于精原细胞的研究实际上就已经涉及到了精原干细胞的内容。经过这些年的发展，目前对于精原干细胞的生物学特性已经有了较多的认识，并在技术上

也已经能够对精原干细胞进行分离培养和活体睾丸内移植，这在一定程度上显示了它在生殖医学中的意义和作用。

1. 精原干细胞是精子发生的细胞基础 精子发生（spermatogenesis）的全过程都发生在睾丸的曲细精管内，其大致过程为：首先由靠近于曲细精管基底膜的 A 型精原细胞分化为B 型精原细胞，进而分化为初级精母细胞（primary spermatocyte）。初级精母细胞经过减数分裂 I 的分裂，产生 2 个次级精母细胞（secondary spermatocyte），再经过减数分裂 II 的分裂，便可产生 4 个精细胞（spermatid）。精细胞再进一步的分化，最终就演变为成熟的精子（spermatozoa），其形态也由圆形变为蝌蚪型。精子发生是一个连续的过程，而且已有结构上的证据。采用组织学方法，就可以观察到处于各个分化阶段的过渡细胞在曲细精管的管壁内，按照精原干细胞向精细胞的分化过程依次从曲细精管的基底膜向其管腔面的方向排列的分布规律。

对于所有哺乳动物来说，其精子发生都遵循这一基本规律。但目前已经知道，精子发生的细节在哺乳动物的不同物种之间则存在一定的差异，而这种差异主要存在于从精原干细胞到初级精母细胞形成的这一分化阶段。由于人和非灵长类动物的精子发生过程的细节目前尚不十分明确，而且还存在一些争议，所以，现仅就小鼠精子发生的过程加以介绍。

小鼠为啮齿类哺乳动物，它的精原细胞分 A、B 两型。从精子发生的角度来讲，它们是处于两个连续分化阶段的细胞，即 A 型精原细胞是较原始的精原细胞，B 型精原细胞是由 A 型精原细胞分化而来的精原细胞。根据各种精原细胞的形态特征，以及其在曲细精管的管壁内的空间排布特征，可以观察到的 A 型精原细胞有单体 A 型精原细胞（A_{single}，A_s）、双合体 A 型精原细胞（A_{paired}，A_{pr}）及链状体 A 型精原细胞（$A_{aligned}$，A_{al}）三型。现在一般认为，A_s 才是真正的精原干细胞，而 A_{pr} 和 A_{al} 仅为精子发生的前体细胞（progenitor cell）。A_s 分裂可能有两种方式：一是其子细胞是互相分离的两个干细胞（即仍然是 A_s 型精原细胞）。通过这种分裂方式，可以保持干细胞数量的平衡，以维持其干细胞库的稳定性；二是其细胞核分裂，但其细胞质分裂不完全，成为以胞质间桥（cytoplasmic bridge）相连的 A_{pr}。A_{pr} 的形成，就标志着该细胞已经进入精子发生的程序。在此基础上，A_{pr} 便可以同样的方式进行多次分裂（即细胞核分裂而细胞质为不完全分裂），由此可以形成四合体细胞、八合体细胞、十六合体细胞，甚至三十二合体细胞。由于这些合体细胞中的核呈线性排列，其间是以胞质间桥连接，故将它们统称为链状体 A 型精原细胞。接下来，链状体 A 型精原细胞将连续分裂 6 次，所产生的子细胞依次称为 A_1、A_2、A_3、A_4、In（intermediate，中间型）和 B 型精原细胞。B 型精原细胞的分裂形成初级精母细胞，进而通过减数分裂 I 形成次级精母细胞，再通过减数分裂 II 形成精细胞，进而演变为成熟的精子。由此可见，精子发生的过程是相当复杂的，不仅使精原干细胞（即 As）最终分化为了成熟的精子，而且也使其干细胞的后裔群体明显扩大。如果将链状体 A 型精原细胞按十六合体计算，那么，1 个精原干细胞（即 As）进入精子发生的程序后，经过 10 次有丝分裂，就可产生 1 024 个初级精母细胞，再经过两次减数分裂，就可产生 4 096 个染色体为单倍体的精细胞。

2. 精原干细胞的分化具有一个复杂的调控机制 精原干细胞分化成 A_1 精原细胞是精子生成过程中不可逆的调控点，机体对之具有相当严格的控制。有研究表明，许多因素可导致从精原干细胞到 A_1 精原细胞之间的各种精原细胞分化进程的停止，如曲细精管中的支持细胞（sertoli cell）受到毒物或辐射的损伤、维生素缺乏、甚至睾丸温度的持续升高等。目前发展了一些动物模型，其精子的发生被可逆抑制，这为研究精原细胞的分化过程提供了有力的工具。其中，有三个模型的精子发生被抑制，A 型精原细胞不能分化但可增殖。在第一个模型中，连续五周给予对大鼠支持细胞有毒性的药物——2,5-己二酮（hexanedione），七周后发

现 A 型精原细胞已不能分化。在第二个模型中，LBNF1 大鼠经 X 线照射，曲细精管上皮退化，精子发生逐渐衰退，但到照射约 15 周后，明显增殖的 A 型精原细胞则仍存在。令人惊奇的是，在这两种模型中，精原细胞分化障碍都能通过用促性腺激素释放激素（GnRH）的激动剂治疗得以缓解。GnRH 激动剂的成功治疗，表明尽管支持细胞因细胞毒药物或照射而受到损伤，但其功能可通过控制激素水平而得以改善。通过己二酮给药大鼠模型，也发现 Kit 受体是精原细胞分化早期的一个关键的调控因素。也有研究发现，干细胞因子（stem cell factor，SCF）是 Kit 受体的配体，它可通过 Kit 受体促进细胞增殖。而且已经知道，精原细胞能表达 kit 受体，而支持细胞表达其配体——SCF。SCF 有可溶的和膜包被的两种形式。啮齿动物出生后不久，精子发育开始即伴随着支持细胞由产生可溶性 SCF 转换至产生膜包被的 SCF，这表明膜包被的 SCF 对精子发生至关重要。有趣的是，在己二酮导致精子发生衰退的大鼠中，支持细胞主要产生可溶形式的 SCF，而用 GnRH 激动剂进行治疗（众所周知 GnRH 能重新刺激精原细胞分化）竟也伴随膜包被 SCF 表达量的增加。这些结果有力证实，Kit-SCF 系统在精原细胞分化中的作用。第三个模型是维生素 A 缺乏症模型，发现缺乏维生素 A 时，大鼠的精原细胞退化，最后仅存 A 型精原细胞。而且，大多 A 型精原细胞是静息的、不能分化的细胞。补充维生素 A 或维甲酸后，分化重新开始，紧接着精子发生完全恢复。据推测，A 型精原细胞中有维甲酸的核受体，因此维甲酸直接对 A 型精原细胞有作用，但是这种作用依赖于支持细胞的存在。

二、癌干细胞

近期的一些实验证据表明，在白血病以及一些实体肿瘤中，只有一小部分肿瘤细胞具有无限的增殖能力，并由此而能够形成新的肿瘤。这些具有肿瘤形成能力的细胞就被称为癌干细胞（cancer stem cell）。癌干细胞可以通过其特征性的表面标志分子，对其进行鉴定和富集，并可将其移植到裸鼠体内而形成新的肿瘤。目前一般认为，肿瘤组织中的细胞是不均一的，它包含有癌干细胞，以及大量异质性的、不具肿瘤形成能力的相关肿瘤细胞。癌干细胞概念的提出，为肿瘤发生机理的认识提供了一条新的思路。

1. 癌干细胞表达一些特异的分子标记　癌干细胞在癌症组织中所占的比例很小，具有肿瘤形成能力是癌干细胞的本质特征。目前已经在乳腺癌、脑瘤等实体肿瘤以及血液系统肿瘤中发现了癌干细胞。鉴定癌干细胞的方法通常是首先通过分子标志将肿瘤细胞悬液用流式细胞仪分选为若干亚群，然后将不同的细胞亚群移植到裸鼠体内观察其成瘤性，癌干细胞就存在于具有成瘤性的细胞亚群中。2003 年，M.Al-Hajj 等人报道了对乳腺癌干细胞的分离，为鉴定癌干细胞奠定了基础。他们首先用流式细胞仪分选原位或转移的乳腺癌组织细胞。所选的筛选标志包括黏附分子 CD44 和 CD24，乳腺/卵巢肿瘤特异性标志 B38.1 和上皮特异性抗原 ESA 等等。流式细胞仪分选出各种标志联合或单独存在的肿瘤细胞，然后将分选的细胞注射到 NOD/SCID 小鼠的皮下观察致瘤性。结果发现，$Lin^-ESA^+CD44^+CD24^{-/LOW}$ 的细胞可以在 NOD/SCID 小鼠中致瘤，而这一群细胞仅占癌组织细胞数的 2%。他们还发现，用 $Lin^-ESA^+CD44^+CD24^{-/LOW}$ 的细胞移植到 NOD/SCID 小鼠后，成瘤后的肿瘤组织中同样包括 $Lin^-ESA^+CD44^+CD24^{-/LOW}$ 表型的细胞，以及 $CD44^-$、$CD24^+$的细胞。这就说明，$Lin^-ESA^+CD44^+CD24^{-/LOW}$ 表型的细胞可以自我更新，产生其他的乳腺癌细胞。这种特性与干细胞类似，在分化的同时还可以自我更新。

2. 癌干细胞可能起源于干细胞　癌干细胞的起源目前仍不清楚。癌干细胞与正常的干细胞有许多相似的地方，但是他们之间也有本质的区别。正常干细胞的维持和分化是受机体精确调控的，但癌干细胞却打破了这一调控，癌干细胞以不可控制的方式自我更新和分

化。尽管目前尚缺乏直接证据证明癌干细胞来源于正常干细胞。但是一些间接证据提示了这种可能性。首先，有研究表明癌干细胞的调控机制与对应组织的正常干细胞有相似性。例如，Sonic hedgehog 信号通路对于维持神经干细胞的增殖十分重要，而 Sonic hedgehog 信号通路的阻断剂环王巴明（cyclopamine）可以选择性杀伤脑肿瘤，这表明该信号通路对脑肿瘤细胞也非常重要。另外，众所周知肿瘤的发生往往伴随了基因突变的积累，单独一个基因的突变通常不会导致肿瘤。这提示了肿瘤干细胞更可能是来源于干细胞而不是分化细胞，因为分化的功能细胞通常寿命较短，不容易产生基因突变的积累。

3. 癌干细胞是一个全新的肿瘤防治研究的靶标　毫无疑问，癌干细胞概念的提出，标志着人们对肿瘤认识的深入，它必将对于肿瘤发生机理，以及其预防和治疗等方面的研究产生深远的影响。首先，这将改变肿瘤治疗的传统思路。传统的肿瘤治疗方法通常是不加区分的杀灭增殖细胞，癌干细胞对这种方法未必敏感，因为癌干细胞可能并不是肿瘤组织中增殖最旺盛的细胞。肿瘤发生干细胞模式的提出将会使研究人员转向寻找对癌干细胞有特异性杀伤作用的分子，这些分子有望成为更加有效的肿瘤治疗药物。另外，该模式的提出也会影响人们对肿瘤耐药性的认识。已经发现干细胞表面存在许多与耐药性相关的转运通道，这些通道可以将药物泵出细胞。与干细胞相似，类似的通道也存在于癌干细胞。这提示了癌干细胞恰恰是导致肿瘤耐药性的细胞。

第五节　干细胞与医学

无论是在基础研究还是应用研究领域，干细胞都具有极其广阔的应用前景。干细胞将对医学、生物学乃至我们的社会带来的巨大影响也许是我们今天所无法想象的。目前干细胞的应用还处于起步阶段，随着对干细胞基础研究的进展，其应用领域必将进一步扩大。

一、细胞治疗

细胞治疗是将正常的干细胞或由其分化产生的功能细胞植入病变部位代偿病变细胞丧失的功能。许多疾病都是细胞功能缺陷或身体器官损伤造成的。干细胞提供了可用于移植的细胞。尤其是人胚胎干细胞的成功建系，有望可以在体外大量的收获胚胎干细胞以及由其分化而来的功能细胞。

现在已经知道，为数众多的神经系统疾病是由于神经细胞死亡，而成熟神经细胞无法分裂加以补充所致。例如，帕金森氏症是由于制造多巴胺的神经元死亡导致的，小儿麻痹是由于支配肌肉运动的神经元死亡的结果。其他一些神经系统的疾病，如阿尔茨海默症、中风、癫痫、泰-萨病（Tay-Sachs）、脑外伤及脊柱伤等都涉及神经元的死亡。因此，神经医学将是从干细胞研究中获益最多的医学领域。例如，利用从小鼠神经组织中分离获得了神经干细胞，在体外增殖若干代后，将神经干细胞诱导分化为合成多巴胺的神经细胞。然后将这些细胞移植入帕金森氏症模型小鼠的脑中，结果发现，小鼠控制运动的能力明显改善。另外，干细胞在肿瘤治疗方法的发展中也具有重要的意义。造血干细胞移植已应用于临床，它是目前治疗血液系统恶性疾病、先天性遗传病，以及多发性和转移性恶性肿瘤疾病的最有效的方法之一。早在 20 世纪 50 年代，临床上就开始应用骨髓移植（BMT）方法来治疗血液系统肿瘤。到 80 年代末，外周血干细胞移植（APBSCT）发展成熟，在提高治疗有效率和缩短疗程方面优于常规疗法，且有令人满意的效果。近年来，随着脐血干细胞移植技术的不断改善，它可能会代替目前自体外周血干细胞移植，为血液病及恶性肿瘤患者带来福音。当然，干细胞治疗在其他疾病，如烧伤、心脏病、糖尿病、风湿性关节炎等

疾病治疗方法的发展中也同样具有重要的意义。另外，工程化的干细胞也可以作为基因治疗的载体，以弥补传统基因治疗方法中其导入基因的目标性和调控性不足的缺陷。

二、组织工程

发育生物学家一直致力于分离成体干细胞来制造可移植的器官，这不仅可避免使用胚胎或胎儿组织而招致的伦理学问题，而且可以克服器官供应短缺和移植后的免疫排斥反应。尽管目前只能利用组织工程的方法制造一些简单的组织或器官。但是组织工程的方法将在治疗先天器官畸形和器官移植等方面具有无可估量的前景，这也是干细胞研究最具魅力的所在。

三、药物的毒性和疗效评价

对人干细胞的研究将有可能改变我们开发药物和测试药物安全性的方式。目前，新药评价首先用人的细胞（如目前广泛使用的是癌细胞等）进行实验，然后再进行进一步的动物实验或人体实验，这样可以大大地提高其评价的有效性。然而，由于人体各种组织细胞（尤其是正常细胞）的来源通常是困难的，所以在目前的药物研发中细胞的应用仍然是有限的。随着人胚胎干细胞诱导分化体系的发展和完善，以及各种人组织特异性干细胞的陆续分离培养，可以相信这将成为药物研发的重要细胞来源。而且可以预料，这样的细胞来源除了可用于评价药物的毒性和疗效外，还可有望用于发展新的方法，为研究环境毒物的潜在作用机制，以及它们对胚胎和胎儿发育的细微影响而提供新的研究模型。

小结

个体的正常发育及其功能维持，有赖于干细胞在空间上和时间上的有序增殖与分化。目前对于干细胞的认识还很初步，其概念正在被不断地补充和修正。但在近些年中，干细胞分离培养技术的快速发展，以及对其分化特性的认识和其科学意义与实用价值的显示，使得干细胞研究领域一跃成为了医学科学，乃至整个生命科学关注的热点，并很快的成为了相关领域知识体系的重要组成部分。

干细胞是指那些具有无限增殖能力、并能分化产生一种或一种以上特化细胞的原始细胞。在个体的整个生长发育过程中的各种组织器官中，几乎都发现了干细胞的存在。这些不同种类的干细胞的分化潜能，以及发挥的生物学作用可有很大的差别。但一般地说，它们总是与其所在组织器官的结构与功能相适应。现在已经知道，干细胞具有一般细胞的基本生命现象，如分裂、分化、迁移、衰老及死亡等，而且也同样地服从于一般细胞调控的基本原理。但是，干细胞也有不同于一般细胞的生物学特性，如在增殖分裂方面的缓慢性和自稳性、以及在分化方面的多潜能性和可塑性等。当然，存在于不同的组织器官、不同的发育阶段，以及不同的生理与病理状态下的干细胞的基本生物学特性和功能行为也是不同的，而且也相应地存在着不同的调控机制。也许正是由于这种生物学基础的存在，干细胞才具备了调控个体生长发育和功能维持的基本能力。

目前，胚胎干细胞的培养体系已经比较成熟，已经能够常规地分离培养人类和小鼠等多个物种的胚胎干细胞。但是，成体干细胞的培养技术则还有待发展。这是因为成体干细胞的种类繁多，而每一种成体干细胞在活体中生活的微环境都是不同，即便是同一类干细胞，它们在不同生理或病理状态下生活的微环境也都会有很大的差别，因此，成体干细胞

的培养技术的发展将是一个长期的任务。关于干细胞的生物学特性及其功能行为调控机制的研究策略和技术体系，目前的发展较快。这主要是分子生物学的研究思路和研究技术的介入，以及细胞生物学中细胞培养技术（如三维培养）和分析方法（如各种示踪分析）发展的结果。特别是各种生长因子、细胞因子、激素和黏附因子的发现与应用，以及其分化诱导体系的建立和各种定点干扰技术的应用，使干细胞的研究进入了一个全新的快速发展时期。但人们也意识到了，对于干细胞各种生命现象发生机制的认识，以及人为干预能力的形成，还有待于系统生物学的概念和其相关技术的综合应用。特别是时空的概念和整体的概念，以及各种高通量的、活体（如基因工程动物体系）的和定量的分析技术，将一定是必不可少的。干细胞在人类疾病的治疗中已经显示出了很好的应用前景，但要真正地进入临床，则还有赖于干细胞生物学基础研究的进步。

就目前来看，干细胞的研究有两个方面最为人们所关注，一是干细胞在发育过程中和成体中的基本生物学特性的细节，二是干细胞在生物医学领域（如组织修复等再生医学问题）中的应用。但是，无论其目的是基础生物学研究，还是生物医学应用，关键的问题还是在于是否能够以定量手段和系统生物学的概念，在分子水平上搞清楚干细胞的功能行为是如何控制的。很显然，这一领域的未来发展是极其具有挑战性的。例如，如何确认调控干细胞功能行为的关键信号以及其相关条件，如何有效地将这些信息应用于各种生物医药问题的解决，等等。

（胡以平）

主要中文参考书及文献

1. 翟中和. 细胞生物学. 北京：高等教育出版社，1995.
2. 宋今丹. 医学细胞生物学. 北京：人民卫生出版社，1997.
3. 汪堃仁，薛绍白，柳惠图. 细胞生物学（第二版）. 北京：北京师范大学出版社，1998.
4. 徐晓利，马涧泉. 医学生物化学. 北京：人民卫生出版社，1998.
5. 翟中和，王喜忠，丁明孝. 细胞生物学. 北京：高等教育出版社，2000.
6. 曾溢滔. 转基因动物与医药产业. 上海：上海教育出版社，2000.
7. 韩贻仁. 分子细胞生物学. 第二版. 北京：科学出版社，2001.
8. 凌诒萍. 细胞生物学. 北京：人民卫生出版社，2001.
9. 邓耀祖，屈伸. 医学分子细胞生物学. 北京：科学出版社，2002.
10. 桂建芳，易梅生. 发育生物学. 北京：科学出版社，2002.
11. 刘凌云，薛绍白，柳惠图. 细胞生物学. 北京：高等教育出版社，2002.
12. 杨抚华，胡以平. 医学细胞生物学. 北京：科学出版社，2002.
13. 章静波. 组织和细胞培养技术. 北京：人民卫生出版社，2002.
14. 章静波，林建银，杨恬. 医学分子细胞生物学. 北京：中国协和医科大学出版社，2002.
15. Alberts B 等著，赵寿元等译. 基础细胞生物学. 上海：上海科学技术出版社，2002.
16. 贲长恩，牛建昭. 分子细胞学与疾病. 北京：人民卫生出版社，2003.
17. 宋今丹. 医学细胞分子生物学. 北京：人民卫生出版社，2003.
18. 王金发. 细胞生物学. 北京：科学出版社，2003.
19. 章静波，宗书东，马文丽. 干细胞. 北京：中国协和医科大学出版社，2003.
20. 汤雪明. 医学细胞生物学. 北京：科学出版社，2004.
21. 夏其昌，曾嵘. 蛋白质化学与蛋白质组学. 北京：科学出版社，2004.
22. 周爱儒. 生物化学. 第六版. 北京：人民卫生出版社，2004.
23. Lewin B 著，余龙，江松敏，赵寿元等译. 基因Ⅷ. 北京：科学出版社，2005.
24. 陈宜张，林其谁. 生命科学中的单分子行为及细胞内实时检测. 北京：科学出版社，2005.
25. 胡以平. 医学细胞生物学. 北京：高等教育出版社，2005.
26. 贾弘禔. 生物化学. 北京：人民卫生出版社，2005.
27. 宋今丹. 医学细胞生物学. 第三版. 北京：人民卫生出版社，2005.
28. 杨恬. 细胞生物学. 北京：人民卫生出版社，2005.
29. 杨福愉. 生物膜. 北京：科学出版社，2005.
30. Karp G 著，王喜忠，丁明孝，张传茂等译. 分子细胞生物学（第三版）. 北京：高等教育出版社，2005.
31. 赵春华. 干细胞原理、技术与临床. 北京：化学工业出版社，2006.
32. 周柔丽. 医学细胞生物学（第二版）. 北京：北京大学医学出版社，2006.
33. 陈晔光，张传茂，陈佺. 分子细胞生物学. 北京：清华大学出版社，2006.
34. 薛京伦. 表观遗传学. 上海：上海科学技术出版社，2006.
35. 韩贻仁. 分子细胞生物学. 第三版. 北京：高等教育出版社，2007.
36. 杨抚华. 医学细胞生物学. 第五版. 北京：科学出版社，2007.
37. 刘友华，王芸庆. 维生素 A 类化合物和二甲基亚砜诱导人早幼粒白血病细胞（HL-60）分化的显微与亚显微结构研究.实验生物学报.1985，18（4）:389-404.
38. 胡以平.干细胞：生物医药研究的新靶标.第二军医大学学报.2002，23:1161-1165.

主要英文参考书及文献

1. Alberts B, et al. Molecular Biology of The Cell. 3nd ed. New York and London: Garland Publishing Inc, 1994.
2. Cooper GM, et al. The Cell: A Molecular Approach. Washington DC: ASM Press Sinauer Associates Inc, 1997.
3. Alberts B, et al. Essential Cell Biology. New York and London: Garland Publishing Inc, 1998.
4. Wolpert L. Principles of Development. London: Oxford University Press, 1998.
5. Karp G. Cell and Molecular Biology: Concept and Experiment. New York: John Whiley and Sons Inc, 1999.
6. Gilbert SF, et al. Developmental Biology. 6th ed. Massachusetts: Sinauer Associates Inc, 2000.
7. Lehninger AL, et al. Principles of Biochemistry. 3nd ed. New York: Worth Publishers, 2000.
8. Lodish H, et al. Molecular Cell Biology. 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2000.
9. Alberts B, et al. Molecular biology of the cell. 4th ed. New York and Landon: Garland Publishing Inc, 2002.
10. Karp G. Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments. 3nd ed. New York: John Wiley and Sons Inc, 2002.
11. Alberts B, et al. Essential Cell Biology. 2nd ed. New York and Landon: Garland Publishing Inc, 2003.
12. Kiessling AA, et al. Human Embryonic Stem Cells. Boston: Jones and Bartlett Publishers Inc, 2003.
13. Lodish H, et al. Molecular Cell Biology. 5th ed. New York: W. H. Freeman and company, 2003.
14. Freshney RI. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. 5th ed. New York: Wiley-Liss, 2005.
15. Nelson DL, et al. Principles of Biochemistry. 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2005.
16. Cooper GM, et al. The Cell: A Molecular Approach. 4th ed. Washington DC: ASM Press Sinauer Associates Inc, 2007.
17. Hunter T, Sefton BM. Transforming gene product of rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980, 77:1311-1315.
18. Capco DG, Wan KM, Penman S. The nuclear matrix Three-dimensional architecture and protein composition. Cell. 1982, 29:847-858.
19. Thorgeirsson SS. Hepatic stem cells. Am J Path. 1993, 142:1331-1333.
20. Luft R. The development of mitochondrial medicine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994, 91:8731-8738.
21. Williams RJ. Bioenergetics. Purpose of proton pathways. Nature. 1995, 376:643.
22. Schatz G. The protein import system of mitochondria. J. Biol. Chem. 1996, 271:31763-31766.
23. Schatz G, Dobberstern B. Common principles of protein translocation across membrane. Science. 1996, 271: 1519-1526.
24. Skulachev VP. Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. FEBS Lett. 1996, 397:7-10.
25. Boyer PD. The ATP synthase-a splendid molecular machine. Annu. Rev. Biochem. 1997, 66:717-749.
26. Newport W. Protein import into mitochondria. Ann. Rev. Biochem. 1997, 66:863-917.
27. Elston T, Wang H, Oster G. Energy transduction in ATP synthase. Nature. 1998, 391:510-512.
28. Ferrari G, Cusella-De Angelis D, Mavilio F, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science. 1998, 279:1528-1530.
29. Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998, 95:13726-13731.
30. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 1998, 282:1145-1147.
31. Bjornson CR, Rietze RL, Vescovi AL, et al. Turning brain into blood: a hematopotic fate adopted by adult

neural stem cells in vivo. Science. 1999, 283:534-537.

32. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. Biochem. J. 1999, 341: 233-249.
33. Gray MW, Buerger G, Lang BF. Mitochondrial evolution. Science. 1999, 283:1476-1481.
34. Koehler CM, Merchant G, Schatz G. How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space. Trends Biochem. Sci. 1999, 24: 428-432.
35. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999, 284:143-147.
36. Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. Science. 1999, 283:1482-1488.
37. Bach SP, Renehan AG, Potten CS. Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. Carcinogenesis. 2000, 21:469-476.
38. Gage FH. Mammalian neural stem cells. Science. 2000, 287:1433-1438.
39. Mieth D. Going to the roots of the stem cell debate. EMBO Rep. 2000, 1: 4-6.
40. Slack JM, Stem cells in epithelial tissues. Science. 2000, 287:1431-1433.
41. Vogel G. In contrast to Dolly, cloning resets telomere clock in cattle. Science, 2000, 288:586-587.
42. Wang ZY, Chen Z. Differentiation and apoptosis induction therapy in acute promyelocytic leukemia. Lancet Oncol. 2000, 1:101-106.
43. Wei G, Schubiger G, Harder F, et al. Stem cell plasticity in mammals and transdetermination in *Drosophila*: common themes. Stem Cells. 2000, 18:409-414.
44. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration and units in evolution. Cell. 2000, 100:157-168.
45. Conlon H, Zadra I, Haas H, et al. The Aspergillus nidulans GATA transcription factor gene are encodes at least three proteins and features three classes of mutation. Mol. Microbiol. 2001, 40:361-375.
46. Meehan RR, Stancheva I. DNA methylation and control of gene expression in vertebrate development. Essays Biochem. 2001, 37:59-70.
47. Putney JW Jr. Cell biology: channeling calcium. Nature. 2001, 410:648-649.
48. Tang G, Minemoto Y, Dibling B, et al. Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. Nature. 2001, 414:313-317.
49. Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, et al. hSIR2 (SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. Cell. 2001, 107:149-159.
50. Xiao CW, Ash K, Tsang BK. Nuclear factor-kappaB-mediated X-linked inhibitor of apoptosis protein expression prevents rat granulosa cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. Endocrinology. 2001, 142:557-563.
51. A rnoult D, Parone P, Martinou JC, et al. Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli. J. Cell Biol. 2002, 159:923-929.
52. Candé C, Cecconi F, Dessen P, et al. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? J. Cell Sci. 2002, 115:4727-4734.
53. Lipton SA, Bossy-Wetzel E. Dueling activities of AIF in cell death versus survival: DNA binding and redox activity. Cell. 2002, 111:147-150.
54. Luttrell LM, Lefkowitz RJ. The role of beta-arrestin in the termination and trusduction of G-protein-coupled receptor signals. J. Cell Sci. 2002, 115:455-465.
55. Maté MJ, Ortiz-Lombardía M, Boitel B, et al. The crystal structure of the mouse apoptosisinducing factor AIF. Nat. Struct. Biol. 2002, 9:442-446.
56. Ohiro Y, Garkavtsev I, Kobayashi S, et al. A novel p53-inducible apoptogenic gene, PRG3, encodes a homologue of the apoptosis-inducing factor (AIF). FEBS Lett. 2002, 524:163-171.

57. Sirri V, Hernandaz-Verdund, Roussel P. Cyclin dependent kinases govern formation and maintenance of nucleolus. J. Cell Bio. 2002, 156:969-981.

58. Carrington JC, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. Science. 2003, 301:336-338.

59. Tsujimoto Y. Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. J. Cell Physiol. 2003, 195:158-167.

60. van Gurp M, Festjens N, van Loo G, et al. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003, 304:487-497.

61. Wang X, Willenbring H, Akkari Y, et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. Nature. 2003, 422:897-901.

62. Chen CZ, Li L, Lodish HF, et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. Science. 2004, 303:83-86.

63. Dou CM, Li JC. Effect of extracts of trichosanthes root tubers on HepA-H cells and HeLa cells. World J. Gastroenterol. 2004, 10:2091-2094.

64. Eissa S, Ahmed MI, Said H, et al. Cell cycle regulators in bladder cancer: relationship to schistosomiasis. IUBMB Life. 2004, 56:557-564.

65. Ivashkiv LB, Hu X. Signaling by STATs. Arthritis Res. Ther. 2004, 6:159-168.

66. Kono T, Obata Y, Wu Q, et al. Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. Nature. 2004, 428:860-864.

67. Li J, Ishii T, Feinstein P, et al. Odorant receptor gene choice is reset by nuclear transfer from mouse olfactory sensory neurons. Nature. 2004, 428:393-399.

68. Nóbrega MA, Zhu Y, Plajzer-Frick I, et al. Megabase deletions of gene deserts result viable mice. Nature. 2004, 431:988-993.

69. Prunier C, Hocevar BA, Howe PH. Wnt signaling: physiology and pathology. Growth Factors. 2004, 22: 141-150.

70. Sebat J, Lakshmi B, Troge J, et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. Science. 2004, 305:525-528.

71. Wesierska-Gadek J, Gueorguieva M, Wojciechowski J, et al. Cell cycle arrest induced in human breast cancer cells by cyclin-dependent kinase inhibitors: a comparison of the efects exerted by roscovitine and olomoucine. Pol. J. Pharmacol. 2004, 56:635-641.

72. Guo Y, Harwalkar J, Stacey DW, et al. Destabilization of cyclin D1 message plays a critical role in cell cycle exit upon mitogen withdrawal. Oncogene. 2005, 24:1032-1042.

73. Moynagh PN. The NF- kappaB pathway. J. Cell Sci. 2005, 118:4589-4592.

74. Li WL, Su J, Yao YC, et al. Isolation and characterization of bipotent liver progenitor cells from adult mouse. Stem Cells. 2006, 24:322-332.

75. Li W, You P, Wei Q, et al. Hepatic differentiation and transcriptional profile of the mouse liver epithelial progenitor cells (LEPCS) under the induction of sodium butyrate. Front Biosci. 2007, 12:1691-1698.

中英文索引

ARP2/3	actin-related proteins2/3　165
ATG	autophagy-related　335
ATP 合酶复合体	ATP synthase complex　128
A 位点	aminoacyl site　207
B 细胞淋巴瘤/白血病-2	B-cell lymphoma/leukemia-2，bcl-2　342
cAMP 的蛋白激酶 A	cAMP-dependent protein kinase A，PKA　264
cGMP 依赖蛋白激酶 G	cGMP dependent protein kinase G，PKG　266
COP Ⅰ	coatmer-protein subunits Ⅰ　119
DNA 变性	DNA denaturation　55
DNA 复制复合体	DNA replication complex　188
DNA 结合域	DNA binding domain　216
DNA 可染性	DNA stainability　345
DNA 克隆	DNA cloning　54
DNA 梯状条带	DNA ladder　339
DNA 微阵列芯片	DNA microarray　59
Fas 配体	Fas ligand，FasL　343
G 蛋白	G protein　261
G 蛋白耦联受体	G protein-coupled receptor　260
Hayflick 界限	Hayflick life span　332
NADH-CoQ 氧化还原酶 1	NADH-CoQ oxidoreductase 1，ND1　129
Northern 印迹杂交	Northern blot　56
N-连接糖基化	N-linked glycosylation　101
P 位点	peptidyl site　207
RNA 干扰	RNA interference，RNAi　57
RNA 可变剪接	alternative splicing　220
RNA 诱导沉默复合物	RNA-induced silencing complex，RISC　58
SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	SDS polyacrylamid gel electrophoresis，SDS-PAGE　48
SD 序列	Shine-Dalgarno sequence　207
Southern 印迹杂交	Southern blot　56
Wiskott Aldrich 综合征	Wiskott Aldrich Syndrome，WAS　168
X-射线衍射	X-ray diffraction　61
X-射线衍射图	diffraction pattern　61
α-螺旋	α-helix　27
α 管蛋白	α-tubulin　147
β_1-整联蛋白	β_1-integrin　361
β-片层	β-sheet　27
β 管蛋白	β-tubulin　147
γ-微管蛋白环形复合体	γ-tubulin ring complex，γ-TuRC　148

A

阿尔茨海默病 Alzheimer's diseases, AD 168
癌干细胞 cancer stem cell 376
癌基因 oncogene 301
氨基聚糖 glycosaminoglycan, GAG 242
氨基酸 amino acid 19
氨酰-tRNA aminoacyl-tRNA 205
暗视野显微镜 dark-field microscope 34

B

巴氏小体 Barr body 179
靶 SNAREs target-SNAREs, t-SNAREs 121
白介素 interleukin, IL 300
白细胞介素-1β 转换酶 interleukin-1β converting enzyme, ICE 342
摆动性 wobble 205
半保留复制 semiconservative replication 22, 189
半桥粒 hemidesmosome 226
伴侣蛋白 chaperone protein 101
包涵素被 clathrin coat 114
胞嘧啶 cytosine, C 19
胞吐作用 exocytosis 85
胞吞作用 endocytosis 85
胞质环 cytoplasmic ring 173
胞质溶胶 cytosol 90
胞质杂种 cybrid 352
被动运输 passive transport 77
边缘板 marginal plate 117
编码链 coding strand 198
编码区 coding region 23, 195
鞭毛 flagella 150
扁囊 ER lamina 98
扁平囊泡 cisternae 107
变态 metamorphosis 325
变形再生 morphallaxis regeneration 329
表观基因组学 epigenomics 8
表观遗传学 epigenetics 8
表皮生长因子 epidermal growth factor, EGF 262, 300
表位 epitope 355
冰冻断裂 freeze-fracture 37
冰冻蚀刻 freeze-etching 37

病毒 virus 14
补偿性再生 compensatory regeneration 329
捕鱼笼式 fish-trap 173
不对称分裂 asymmetry division 362
不对称转录 asymmetric transcription 198
不均一核 RNA heterogeneous nuclear RNA, hnRNA 200

C

残留小体 residual body 113
操纵子 operon 213
侧向抑制 lateral inhibition 325
层粘连蛋白 laminin, LN 252
差速离心法 differential centrifugation 44
差异表达 differential expression 315
产力 force generation 159
长春新碱 vinblastine 149
肠干细胞 intestinal stem cell 373
常规剪接 constitutive splicing 219
常染色质 euchromatin 178
超螺线管 supersolenoid 180
超数排卵 superovulation 354
超微结构 ultrastructure 36
沉默子 silencer 215
成核 nucleation 148
成核期 nucleation phase 148
成人早衰症 Werner's syndrome 333
成熟促进因子 maturation promoting factor, MPF 296
成熟面 mature face 107
成体干细胞 adult stem cell 7
成体干细胞 somatic stem cell 360
成纤维细胞 fibroblast 332
成纤维细胞生长因子 fibroblast growth factor, FGF 324
重新编程 reprogramming 352
重组小结 recombination nodule 286
程序性细胞死亡 programmed cell death, PCD 5, 336
初级精母细胞 primary spermatocyte 375
初级溶酶体 primary lysosome 113
传代培养 secondary culture 42
串联质谱 tandem mass spectrometry, MS/MS 60
磁矩 magnetic moment 61
次级精母细胞 secondary spermatocyte 375
次级溶酶体 secondary lysosome 113
次缢痕 secondary constriction 181

粗肌丝 thick myofilament 158
粗面内质网 rough endoplasmic reticulum, RER 99
粗线期 pachytene stage 286
存活基因 survival gene 342

D

大规模培养 bulk culture 348
大囊泡 vacuoles 107
代谢废物累积 waste product accumulation 334
代谢耦联 metabolic coupling 230
带型 band 183
戴帽 capping 200
单纯性大疱性表皮松解症 epidermolysis bullosa simplex 168
单分子荧光成像 single molecular fluorescence imaging 52
单克隆抗体 monoclonal antibody 355
单能 unipotency 311
单能或专能性干细胞 unipotent stem cell 7
单顺反子 monocistron 23
单糖 monosacharide 19
单位膜 unit membrane 63
胆固醇 cholesterol 64
胆管反应 ductular reaction 374
胆碱磷酸转移酶 choline phosphotransferase 105
蛋白二硫键异构酶 protein disulfide isomerase, PDI 101
蛋白聚糖 proteoglycan, PG 242
蛋白酪氨酸激酶 protein tyrosine kinase, PTK 269
蛋白质 protein 26
蛋白质芯片 protein chip 59
蛋白质组 proteome 59
蛋白质组学 proteomics 1, 59
导肽 leader peptide 118
等电点 isoelectric point 48
等电聚焦 isoelectric focusing 48
低密度脂蛋白 low-density lipoprotein, LDL 105
底物水平磷酸化 substrate-level phosphorylation 137
第二信使 second messenger 264
电穿孔术 electroporation 350
电耦联 electric coupling 230
电喷雾电离质谱 electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS 60
电泳 electrophoresis 48
电子传递呼吸链 electron transport respiratory chain 139
电子显微镜 electron microscope, EM 35
凋亡小体 apoptotic body 335

顶端外胚层帽 apical ectodermal cap 329
顶体 acrosome 116
动力蛋白 dynein 151
动力蛋白臂 dynein arm 150
动粒 kinetochore 181
动粒结构域 kinetochore domain 181
动粒微管 kinetochore microtubule 281
动态不稳定性 dynamic instability 148
动质 ergastoplasm 97
毒蕈 amanita phalloides 157
端粒 telomere 177，182，333
端粒酶 telomerase 361
端粒钟 telomere clock 333
端着丝粒染色体 telocentric chromosome 181
断裂基因 split gene 195
对称分裂 symmetry division 362
对向运输 antiport 83
钝性末端或平滑末端 blunt end 53
多倍体 polyploid 316
多级螺旋化模型 multiple coiling model 180
多聚谷氨酰胺疾病 polyglutamine disease 168
多聚核糖体 polyribosome 210
多能（干）细胞 pluripotent cell 311
多能性干细胞 pluripotent stem cell 7，360
多泡小体 multivesicular body 113
多顺反子 polycistron 23
多萜醇 dolichol 101
多线体 polyteny 316

E

二价体 bivalent 285
二聚体 dimer 28，250
二酯酰甘油 diacylglycerol，DAG 264

F

发动蛋白或缢断蛋白 dynamin 87，119
发夹结构 hairpin structure 199
发射光 emission light 33
发芽 budding 338
翻译 translation 23，194，204
反密码子 anticodon 24，205

反面	trans face 107
反面高尔基网状结构	trans Golgi network 108
反式作用因子	trans-acting factor 215
反义链	antisense strand 198
反转录病毒	retrovirus 355
泛素-蛋白酶体	ubiquitin-proteasome 211
泛素化	ubiquitination 211
房室	compartment 97
纺锤体	spindle 281
放射辐条	radial spoke 150
非编码区	non-coding region 195
非翻译区	untranslated region, UTR 23
非连续分泌	discontinuous secretion 110
非细胞体系	cell free system 45
非组蛋白	nonhistone 178
分辨率	resolution 32
分节基因	gap gene 319
分泌泡	secreting vacuoles 107
分支点	branch site 201
分子伴侣	molecular chaperone 27, 101
封闭蛋白	claudin 224
封闭连接	occluding junction 223
辐	spoke 173
负性调控	negative regulation 211
复性	renaturation 55
复制叉	replication fork 189
复制源	replication origin 177
复制子	replicon 189

G

钙蛋白酶	calpain 339
钙调蛋白	calmodulin, CaM 267
钙黏素	cadherin 226
钙网素	calreticulin 101
干细胞	stem cell 306, 360
甘露糖-6-磷酸	mannose-6-phosphate, M-6-P 114
肝干细胞	liver stem cell 373
肝母细胞	hepatoblast 373
肝素	heparin 242
冈崎片段	Okazaki fragment 190
高度重复序列	highly repetitive sequence 196
高尔基复合体	Golgi complex 107
高尔基体	Golgi body 107

高尔基体堆 Golgi stack 107
高尔基中间膜囊 medial Golgi stack 108
高压透射电镜 high-voltage electron microscope, HVEM 37
高压液相层析 high performance liquid chromatography, HPLC 46
共聚焦激光扫描显微镜 confocal laser scanning microscope 35
构象 conformation 27
古细菌 archaeobacteria 10
骨架-放射环模型 scaffold-radial loop structure model 180
骨髓间充质干细胞 bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs 357
管家基因 housekeeping gene 212, 315
光学显微镜 light microscope 32
胱天蛋白酶 cystein aspartic acid specific protease, caspase 339
鬼笔环肽 phalloidin 157
过渡放大细胞 transit amplifying cell 361
过氧化物酶体 peroxisome 116
过氧化物酶体蛋白分选信号序列 peroxisomal targeting signal, PTS 118

H

含铁小体 siderosome 113
合核体 synkaryon 43
核被膜 nuclear envelope 170
核磁共振光谱仪 nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR 61
核定位信号 nuclear localization signal, NLS 174
核定位序列 nuclear localization sequence, NLS 174
核分裂 karyokinesis 3
核苷酸 nucleotide 19
核骨架 nuclear scaffold 187
核基质 nuclear matrix 187
核基质蛋白 nuclear matrix protein 187
核基质结合蛋白 nuclear matrix associated protein 187
核孔 nuclear pore 172
核孔蛋白 nucleoporin, Nup 173
核孔复合体 nuclear pore complex, NPC 173
核篮 nuclear cage 173
核膜 nuclear membrane 170
核仁 nucleolus 184
核仁基质 nucleolar matrix 185
核仁素 nucleolin 185
核仁相随染色质 nucleolar associated chromatin 185
核仁周期 nucleolar cycle 186
核仁周围染色质 perinucleolar chromatin 185
核仁组织区 nucleolar organizing region 182
核仁组织者 nucleolar organizer 184

核酸	nucleic acid 19
核酸内切酶 G	endonuclease G 344
核糖核酸	ribonucleic acid, RNA 19
核糖体	ribosome 24, 206
核糖体 RNA	ribosomal RNA, rRNA 194
核糖体结合位点	ribosomal binding site, RBS 207
核糖体循环	ribosome circulation 209
核纤层	nuclear lamina 175
核纤层蛋白	lamin 175, 297
核纤层蛋白 B 受体	lamin B receptor 171
核小体	nucleosome 179, 338
核小体组蛋白	nucleosomal histone 177
核心核小体亚单位	core nucleosomal subunit 338
核型	karyotype 183
核质	karyoplasm 3
核质环	nuclear ring 173
核周池	perinuclear cisternae 172
核周间隙	perinuclear space 172
核转运受体	nuclear transport receptor 174
亨廷顿舞蹈病	Huntington disease, HD 168
恒定型分泌	constitutive secretion 110
横桥	cross bridge 158
后期促进复合物	anaphase-promoting complex, APC 292
后溶酶体	post-lysosome 113
后随链	lagging strand 190
呼吸链	respiratory chain 139
滑动丝模型	sliding filament model 158
滑面内质网	smooth endoplasmic reticulum, SER 99
化学渗透假说	chemiosmotic coupling hypothesis 141
化学突触	chemical synapse 229
环孢素	cyclosporin 339
环带亚单位	annular subunit 173
环磷酸鸟苷	cyclic GMP, cGMP 265
环磷酸腺苷	cyclic AMP, cAMP 264
回文	palindrome 53
混合功能氧化酶	mixed function oxidase 106
活性氧	reactive oxygen species, ROS 143
活性阻遏蛋白	active repressor 218

J

肌动蛋白	actin 153
肌动蛋白皮层	actin cortex 157
肌动蛋白丝	actin filament 153

肌钙蛋白	troponin 158
肌球蛋白	myosin 151，158
肌萎缩性侧索硬化症	amyotrophic lateral sclerosis，ALS 168
肌小节	sarcomere 158
肌质网	sarcoplasmic reticulum 98，106
基底膜	basal lamina 或 basement membrane 253
基粒	elementary particle 128
基体	basal body 150
基因	gene 193
基因表达	gene expression 194
基因家族	gene family 195
基因敲除	knock out 57
基因文库	gene library 54
基因芯片	gene chip 59
基因转移	gene transfer 353
基因组	genome 8，13，177
基因组学	genomics 1
基因组印记	genomic imprinting 8，320
基因座控制区	locus control region，LCR 318
基质导入序列	matrix-targeting sequence，MTS 132
基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱	matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight，MALDI-TOF-MS 60
畸胎瘤	teratocarcinoma 327，365
激发光	excitation light 33
激光捕获显微切割技术	laser capture microdissection，LCM 41
激活蛋白	activator 218
级联效应	cascade 271
极低密度脂蛋白	very-low-density lipoprotein，VLDL 105
极间微管	polar microtubule 282
加单氧酶	monooxygenase 106
加尾	tailing 201
假基因	pseudogene 196
间充质干细胞	mesenchymal stem cell，MSC 370
间隙连接	gap junction 229
兼性异染色质	facultative heterochromatin 178
检测点	checkpoint 298
剪接	splicing 201
剪接体	spliceosome 201
减数分裂	meiosis 3，284
简单扩散	simple diffusion 77
胶原	collagen 246
胶原病	collagen disease 249
胶原纤维	collagen fiber 247
胶原原纤维	collagen fibril 247
酵母双杂交	yeast two-hybridization 58

阶段特异性胚胎抗原-1　stage-specific embryonic antigens 1，SSEA-1　361
结合　attachment　159
结构单位　unit structure　98
结构基因　structural gene　193
结构异染色质　constitutive heterochromatin　178
结构域　structural domains　28
结合变构机制　binding-change mechanism　142
姐妹染色单体　sister chromatid　181
金属投影法　metal shadowing　37
紧密连接　tight junction　224
近分泌相互作用　juxtacrine interaction　324
精原干细胞　spermatogonial stem cell　374
精原细胞　spermatogonium　374
精子　spermatozoa　375
精子发生　spermatogenesis　375
聚合酶链式反应　polymerase chain reaction，PCR　54
聚合期　polymerization phase　148

K

抗凋亡基因　anti-apoptosis gene　341
颗粒成分　granular component　185
颗粒内质网　granular endoplasmic reticulum，GER　99
可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子接合蛋白受体　soluble N-ethyl maleimide-sensitive factor attachment protein receptor，SNAREs　121
克隆载体　cloning vector　54
孔环状片层　annulate lamellae　100
跨膜蛋白　transmembrane protein　68，364
跨膜粘连蛋白　transmembrane adhesion protein　226

L

老年斑　age spots　333
酪氨酸蛋白激酶型受体　tyrosine-specific protein kinase receptor，TPKR　262
类核体　nucleoid　116
类晶体　crystalloid　116
类胚体　embroyoid body　367
离子通道　ion channel　78
离子通道型受体　ion channel receptor　259
连接 DNA　linker DNA　179
连接区　linker　338
连接子　connexon　229
连接子蛋白　connexin，Cx　229

连续分泌	continuous secretion 110
联会	synapsis 285
联会复合体	synaptonemal complex, SC 285
联接蛋白	syntaxin 121
两性电解质	ampholyte 48
亮氨酸拉链	leucine zipper 217
亮氨酸拉链	leucine zipper, L-Zip 28
磷脂	phospholipid 64
磷脂酶 C	phospholipase C, PLC 267
磷脂酸	phosphatidic acid 105
磷脂转换蛋白	phospholipid exchange proteins, PEP 105
磷脂转移蛋白	phospholipid transfer protein 106
流动镶嵌模型	fluid mosaic model 75
流式细胞仪	flow cytometer 40
硫酸角质素	keratan sulfate, KS 242
硫酸皮肤素	dermatan sulfate, DS 242
硫酸软骨素	chondroitin sulfate, CS 242
硫酸乙酰肝素	heparan sulfate, HS 242
绿色荧光蛋白	green fluorescent protein, GFP 51, 119
卵圆细胞	oval cell 374
螺线管	solenoid 180
螺旋	coiled-coil 161
螺旋-环-螺旋	helix-loop-helix, HLH 28, 217
螺旋-转角-螺旋	helix-turn-helix, HTH 217
螺旋-转角-螺旋结构域	helix-turn-helix domain 316

M

马达蛋白	motor protein 151
毛缘蛋白	fimbrin 157
锚泊蛋白	docking protein 102
锚定连接	anchoring junction 223
锚定依赖性生长	anchorage dependent growth 255
酶	enzyme 29
酶细胞化学技术	enzyme cytochemistry 50
美国宇航局的生物反应器	NASA bioreactor 356
弥散状	smear 339
米勒模拟实验	Miller's simulated experiment 16
密封蛋白	occludin 224
密码子	codon 23, 204
免疫沉淀	immuno-precipitation, IP 58
免疫磁珠	immunomagnetic microsphere 40
免疫球蛋白超家族	immunoglobin-superfamily, Ig-SF 235
免疫细胞化学技术	immunocytochemistry, ICC 50

模板链 template strand 198
膜联细胞命运因子 membrane-associated cell fate determinant 362
膜泡运输 vesicular transport 85
膜生物学 membrane biology 1
膜脂 membrane lipid 64
膜转运蛋白 membrane transport protein 77
母源效应基因 maternal effect gene, MEG 316

N

囊泡 vesicle 118
囊泡 SNAREs vesicle-SNAREs, v-SNAREs 121
囊泡相关膜蛋白 vesicle-associated membrane protein, VAMP 121
囊泡转运 vesicular transport 120
囊胚内细胞团 inner cell mass, ICM 7
内含子 intron 5, 195
内核膜 inner nuclear membrane 171
内开始转移肽 internal start-transfer peptide 103
内膜系统 endomembrane system 97
内胚层 endoderm 310
内体 endosome 114
内体性溶酶体 endolysosome 114
内网器 internal reticular apparatus 106
内细胞团 inner cell mess, ICM 360
内源性核酸内切酶 endonuclease 338
内质网 endoplasmic reticulum, ER 97
内质网-高尔基体中间体 ER-to-Golgi intermediate compartment 119
拟核 nucleiod 170
逆向运输 retrograde transport 120
黏多糖 mucopolysaccharide 242
黏合带 adhesion belt 226
黏合连接 adhering junction 226
黏着斑 adhesion plaque 226
粘性末端 cohesive end 53
鸟苷酸环化酶 guanylate cyclase, GC 265
鸟嘌呤 guanine, G 19
尿嘧啶 uracil, U 19

O

偶线期 zygotene stage 285

P

旁分泌因子 paracrine factor 324
旁分泌 paracrine 6
胚胎干细胞 embryonic stem cell, ESC 7, 43, 360
胚胎生殖嵴 gonadal ridge 365
胚胎生殖细胞 embryonic germ cell 365
胚胎诱导 embryonic induction 323
配对结构域 pairing domain 181
配体 ligand 259
片段化 fragmentation 339
片状伪足 lamellipodia 157
嘌呤霉素 puromycin 102
平衡沉降 equilibrium sedimentation 45
平衡期 equilibrium phase 148
葡萄糖调节蛋白 94 glucose regulated protein94, GRP94 101

Q

七位复件 heptad repeat 161
启动子 promoter 194
起泡 zeiosis 338
器官发生 organogenesis 311
前导链 leading strand 190
前核仁体 prenucleolar body 187
前胶原分子 procollagen 247
前溶酶体 prelysosome 113
前肽 prepeptide 247
腔内亚单位 luminal subunit 173
强直构象 rigor conformation 159
桥粒 desmosome 226
桥粒斑 desmosomal plaque 227
桥粒连接 desdosome junction 226
亲核蛋白 karyophilic protein 174
秋水仙素 cochicine 149
驱动蛋白 kinesin 5, 151
趋化 chemotaxis 167
去分化 dedifferentiation 313, 363
全能（干）细胞 totipotent cell 311
全能性干细胞 totipotent stem cell 7, 360
全能性细胞核 totipotent nucleus 311

R

染色体 chromosome 176，180
染色体生物学 chromosome biology 1
染色体荧光染料 fluorochromes 345
染色质 chromatin 176
染色质凝聚 chromatin condensation 337
染色质重塑 chromatin remolding 218
热休克蛋白 70 heat shock protein 70，HSP70 101
人类基因组计划 human genome project，HGP 5
人类免疫缺陷病毒 human immunodeficiency virus，HIV 346
溶酶体 lysosome 111
溶酶体结合膜蛋白 lysosomal-associated membrane protein，LAMP 112
溶酶体整合膜蛋白 lysosomal integral membrane protein，LIMP 112
融合蛋白 fusion protein 121
融合复合物 fusion complex 121
乳糖操纵子 lac operon 213。

S

三级溶酶体 tertiary lysosome 113
三磷酸肌醇 inositol trisphosphate，IP3 264
三羧酸循环 tricarboxylic acid cycle，TAC 137
扫描电子显微镜 scanning electron microscope，SEM 37
扫描探针显微镜 scanning probe microscope，SPM 38
奢侈蛋白 luxury protein 315
奢侈基因 luxury gene 315
神经干细胞 neural stem cells，NSC 371
神经前体细胞 neuronal precursor cell 325
神经生长因子受体 nerve growth factor receptor，NGFR 343
生长因子 growth factor 300
生肌蛋白 myogenin 313
生物工程 bioengineering 347
生物技术 biotechnology 347
生物膜 biomembrane 63
生物芯片 biochip 59
生物氧化 biological oxidation 136
失巢凋亡 anoikis 8，339
视黄酸 retinoic acid 330
释放 release 159
嗜酸性小体 councilman's body 338

噬菌体展示	phage display 58
收缩环	contractile ring 283
受体	receptor 259
受体介导的内吞作用	receptor mediated endocytosis 86
双亲性分子	amphipathic molecule 65
双线期	diplotene stage 286
顺面	cis face 107
顺面高尔基网状结构	cis Golgi network 108
顺式作用元件	cis-acting element 215
顺向转移	anterograde transport 120
丝氨酸/苏氨酸激酶	serine/threonine kinase, STK 271
丝状蛋白	fibrous protein 161
丝状伪足	filopodia 157
四分体	tetrad 285
四聚体	tetramer 161
饲养细胞层	feeder layer 43
速度沉降	velocity sedimentation 45
随体	satellite 182
髓样结构	myelin figure 113
髓样体	myeloid body 100

T

踏车运动	treadmilling 149
肽	peptide 26
弹性蛋白	elastin 249
弹性蛋白酶	elastase 250
糖蛋白	glycoprotein 30
糖基化	glycosylation 101
糖基转移酶	glycosyltransferase 109
糖酵解	glycolysis 137
糖脂	glycolipid 30, 64
体细胞核移植	somatic cell nuclear transfer 352
停止转移肽	stop-transfer peptide 或 halt-transfer peptide 103
停止转移信号	stop-transfer signal 103
通道蛋白	channel protein 77
通讯连接	communicating junction 223, 229
通用转录因子	general transcription factor 200
同核体	homokaryon 43, 350
同向运输	symport 83
同源盒	homeobox 321
同源盒基因	homeobox gene 5, 321
同源结构域	homeodomain 321

同源克隆 homologous cloning 352
同源染色体 homologous chromosomes 285
同源异形基因 homeotic gene 321
同源异形转变 homeosis 321
同源域蛋白 homeodomain protein 321
透明质酸 hyaluronic acid, HA 242
透射电子显微镜 transmission electron microscope, TEM 36
吞（或异）噬性溶酶体 phagolysosome 113
调控基因 regulatory gene 193
调控区域 control region 317
脱氧核糖核酸 deoxyribonucleic acid, DNA 19

W

外核膜 outer nuclear membrane 171
外胚层 ectoderm 310
外显子 exon 195
外在膜蛋白 extrinsic membrane protein 68
晚期内吞体 late endosome 115
网格蛋白 clathrin 86
网格蛋白有被囊泡 clathrin-coated vesicle 119
微变态再生 epimorphosis regeneration 329
微刺 microspike 157
微带 miniband 180
微管 microtubule 146
微管蛋白-GTP 帽 tubulin-GTP cap 148
微管结合蛋白 microtubule associated protein, MAP 147
微管组织中心 microtubule organizing center, MTOC 147
微粒体 microsome 44, 97
微绒毛 microvilli 157
微丝 microfilament, MF 153
微体 microbody 116
微小 RNA microRNA, miRNA 25, 322
微载体 microcarriers 349
无活性溶酶体 inactive lysosome 113
无颗粒内质网 agranular endoplasmic reticulum, AER 100
无丝分裂 amitosis 3, 280

X

系统性红斑狼疮 systemic lupus erythematosus, SLE 345
细胞 cell 1

细胞表面	cell surface 90
细胞凋亡	apoptosis 8，335
细胞凋亡蛋白酶活化因子-1	apoptosis protease activating factor-1，Apaf-1 341
细胞分化	cell differentiation 7，310
细胞分化主导基因	master control gene 319
细胞分裂	cell division 279
细胞分裂周期基因	cell division cycle gene，Cdc gene 301
细胞工程	cell engineering 347
细胞骨架	cytoskeleton 146
细胞核	nucleus 12
细胞核移植	nuclear transfer 351
细胞呼吸	cellular respiration 136
细胞化学技术	cytochemistry technique 50
细胞坏死	necrosis 335
细胞决定	cell determination 311
细胞连接	cell junction 223
细胞膜	cell membrane 12，63
细胞内锚定蛋白	intracellular anchor protein 226
细胞培养	cell culture 41
细胞皮层	cell cortex 157
细胞融合	cell fusion 43，350
细胞色素 C	cytochrome C，cyt C 339
细胞色素 C 氧化酶 1	cytochrome C oxidase Ⅰ，COX Ⅰ 129
细胞社会学	cytosociology 1
细胞生理学	cytophysiology 1
细胞生物学	cell biology 1
细胞衰老	cellular aging，cell senescence 7，331
细胞死亡	cell death 8
细胞松弛素 B	cytochalasin B 157
细胞通讯	cell communication 230
细胞外被	cell coat 90
细胞外基质	extracellular matrix，ECM 241，358
细胞系	cell line 42
细胞氧化	cellular oxidation 136
细胞遗传学	cytogenetics 1
细胞杂交	cell hybridization 43，350
细胞黏附分子	cell adhesion molecule，CAM 231
细胞粘连	cell adhesion 223
细胞质	cytoplasm 3，12
细胞质溶胶	cytosol 45
细胞周期	cell cycle 7，279
细胞周期蛋白	cyclin 291
细胞周期蛋白依赖性激酶	cyclin-dependent kinase，Cdk 292
细胞周期检查点	cell cycle checkpoint 7

细胞皱缩	cell shrinkage 337
细胞株	cell strain 42
细胞自噬	autophagy 335
细胞组学	cytomics 2
细肌丝	thin myofilament 158
细线期	leptotene stage 285
纤连蛋白	fibronectin, FN 250
纤毛	cilia 150
纤维蛋白	fibrillarin 185
纤维中心	fibrillar center 184
衔接蛋白	adaptor 119
显微操作	micromanipulation 351
显微操作仪	micromanipulator 351
显微结构	microscopic structure 33
线粒体	单数 mitochondion; 复数 mitochondria 127
线粒体 DNA	mitochondrial DNA, mtDNA 129
线粒体疾病	mitochondrial disorders 144
线粒体膜通透性改变	mitochondrial permeability transition 142
线粒体脑肌病	mitochondrial encephalomyopathy 144
线粒体内膜非特异性通透性孔道	mitochondrial permeability transition pore, MPTP 143
线粒体渗透转变孔	permeability transition pore, PT pore 339
腺苷酸环化酶	adenylate cyclase, AC 261
腺嘌呤	adenine, A 19
相差显微镜	phase contrast microscope 34
消化泡	digestive vacuole 113
小干扰 RNA	small interferencing RNA, siRNA 58, 322
小管	ER tubule 98
小核 RNA	small nuclear RNA, snRNA 24, 201
小核仁 RNA	small nucleolar RNA, snoRNA 186
小囊泡	vesicles 107
小泡	ER vesicle 98
效应蛋白	effector protein 261
协同翻译插入	cotranslation insertion 103
锌指	zinc finger 216
信号识别颗粒	signal recognition particle, SRP 102
信号识别颗粒受体	SRP-receptor, SRP-R 102
信号肽	signal peptide, signal sequence 102
信号肽假说	signal hypothesis 4, 102
信号网络	signaling network 258
信号转导	signal transduction 6, 258
信号转导通路	signaling pathway 6
信使 RNA	messenger RNA, mRNA 194
星体	aster 281
形成面	forming face 107

胸腺嘧啶 thymine，T 19
悬浮培养 suspension culture 348
选择素 selectin 233
血小板源生长因子 platelet-derived growth factor，PDGF 262，300

Y

芽生 budding 120
亚端着丝粒染色体 subtelocentric chromosome 181
亚细胞蛋白质组学 subcellular proteomics 8
亚显微结构 submicroscopic structure 12，36
亚中着丝粒染色体 submetacentric chromosome 181
延长期 elongation phase 148
延迟期 lag phase 148
氧化-还原 redox 143
氧化磷酸化 oxidative phosphorylation 137
液态镶嵌模型 fluid mosaic model 4
衣被小泡 coated vesicle 107
医学细胞生物学 medical cell biology 6
胰岛素 insulin 262
移位子 translocon 102
遗传密码 genetic code 204
异核体 heterokaryon 43，350
异染色质 heterochromatin 178
异体吞噬泡 heterophagic vacuole 113
异养生物 heterotroph 127
异质性 heterogenous 112
抑癌基因 anti oncogene 302
抑素 chalone 300
易化扩散 facilitated diffusion 80
应力纤维 stress fiber 157
婴幼儿早衰症 Hutchinson-Gilford syndrome 333
荧光共振能量转移 fluorescence resonance energy transfer，FRET 52
荧光激活细胞分选仪 fluorescence activated cell sorter，FACS 40
荧光显微镜 fluorescence microscope 33
有被小泡 coated vesicle 86
有被小窝 coated pits 86
有丝分裂 mitosis 3，280
有丝分裂器 mitotic apparatus 282
有意义链 sense strand 198
幼稚性脊柱肌肉萎缩症 infantile spinal muscle atrophy 168
原癌基因 proto-oncogene 5，301
原代培养 primary culture 42

原核细胞	prokaryotic cell 10
原肌球蛋白	tropomyosin 158
原溶酶体	proto-lysosome 113
原生质	protoplasm 2，18
原位杂交技术	in situ hybridization，ISH 55
原子力显微镜	atomic force microscope，AFM 39
运输小泡	transfer-vesicle 107

Z

杂交	hybridization 55
杂交瘤	hybridoma 43，355
杂种细胞	hybrid cell 43，350
载体蛋白	carrier protein 77
再生	regeneration 328
再生胚芽	regeneration blastema 329
再结合	reattachment 159
在稳定期	steady state phase 148
早期内吞体	early endosome 115
造血干细胞	hematopoiesis stem cell，HSC 369
增强子	enhancer 215
折叠	folding 27
真核细胞	eukaryotic cell 10
真细菌	eubacteria 10
整合膜蛋白	integral membrane protein 364
整联蛋白	integrin 5，165，227，364
正性调控	positive regulation 211
支持细胞	sertoli cell 375
脂筏	lipid rafts 71
脂肪酸	fatty acid 19
脂褐质	lipofuscin 113
脂锚定蛋白	lipid anchored protein 68
脂酰辅酶 A	fatty acyl CoA 105
脂酰基转移酶	acyl transferase 105
脂质体	lipofectamine 353
直立	cocked 159
质膜	plasma membrane 63
致密纤维组分	dense fibrillar component 185
滞留信号肽	retention signal peptide 101
中度重复序列	moderately repetitive sequence 196
中间纤维	intermediate filaments，IF 160
中胚层	mesoderm 310
中心法则	central dogma 4，194

中心结构域	central domain 181
中心粒	centriole 148，281
中心粒旁物质	pericentriolar material 148
中心体	centrosome 148，281
中央颗粒	central granule 173
中央鞘	central sheath 150
中央栓	central plug 173
中着丝粒染色体	metacentric chromosome 181
终变期	diakinesis stage 286
终末溶酶体	telolysosome 113
终止子	terminator 195
肿瘤坏死因子受体	tumor necrosis factor receptor，TNFR 343
重链结合蛋白	heavy-chain binding protein，BiP 101
主动运输	active transport 77
主缢痕	primary constriction 181
驻留蛋白	retention protein 101
柱层析	column chromatography 46
柱状亚单位	column subunit 173
专能性成体干细胞	multipotent somatic stem cell 360
专能性干细胞	multipotent stem cell 360
专能性前体细胞	multipotent progenitors，MPPs 361
转分化	transdifferentiation 313，363
转化	transformation 56
转化生长因子	transforming growth factor，TGF 300
转基因动物	transgenic animal 353
转决定	transdetermination 312
转录	transcription 22，194
转录激活域	activating domain 216
转录因子	transcription factor 28
转录因子	transcription factor，TF 200
转染	transfection 56
转肽酶	transpeptidase 207
转位接触点	translocation contact site 128
转位酶	flippase 105
转移器	translocation apparatus 或 translocator 102
转运 RNA	transfer RNA，tRNA 194
着丝点	centromere 177
着丝粒	centromere 181
紫杉醇	taxol 149
自噬体	autophagosome 335
自噬溶酶体	autophagolysosome，autolysosome 113，335
自噬性凋亡	autophagic apoptosis 8
自体吞噬泡	autophagic vacuoles 113
自稳定性	self-maintenance 362

自我更新	self-renewing 362
自旋	spin 61
自养生物	autotroph 127
阻遏蛋白	repressor 213，218
组成性表达	constitutive expression 212
组蛋白	histone 177
组蛋白密码	histone code 8，320
组织工程化组织	tissue engineered tissue 358
组织特异性干细胞	tissue specific stem cell 360